

Humboldt-Universität zu Berlin

**Zur Populations- und Aktivitätsdynamik des nützlichen
Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn nach Introduction
in natürliche Systeme von Pflanze und Boden**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum horticulturnrum

(Dr. rer. hort.)

eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Gartenbauingenieur Jens Zimmer
geb. am 24.02.1968 in Großröhrsdorf (Sa.)

Dekan
der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
Prof. Dr. Uwe Jens Nagel

Gutachter: 1. Prof. em. Dr. Dr. h.c. H. Bochow
2. Dr. K.-D. Hentschel
3. Prof. Dr. U. Burth

eingereicht: Juni 2003

Datum der Promotion: 05.12.2003

Kurzfassung

Zimmer, Jens: **Zur Populations- und Aktivitätsdynamik des nützlichen Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn nach Introduktion in natürliche Systeme von Pflanze und Boden**

Die Besiedlung der Pflanzenwurzel und das Vorhandensein aktiver Zellen sind grundlegende Voraussetzungen für das Zustandekommen phytoeffektiver und Pathogen unterdrückender Effekte durch Applikation des Nutzbakteriums *Bacillus subtilis*. Der Einfluss ökologischer und edaphischer Faktoren auf das Besiedlungsverhalten der introduzierten Bakterien wurde im Rahmen umfangreicher populations- und aktivitätsdynamischer Untersuchungen ergründet. Die Versuche wurden in drei verschiedenen Substrattypen an der Modellpflanze Erbse (*Pisum sativum* L. cv. 'Bördi') unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer durchgeführt.

Die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* war in starkem Maße abhängig von der angewendeten Dosis. Die Verwendung von Kaliumnitrat, Sand oder Maisstärke als Trägerstoff für die *Bacillus subtilis*-Formulierung war für das Besiedlungsverhalten des Nutzbakteriums unerheblich.

Die Entwicklung von *Bacillus subtilis*-Populationen an Pflanzenwurzel und im Substrat war temperaturabhängig. Höhere Versuchstemperaturen hatten größere Populationsdichten zur Folge. Der Temperatureinfluss war in Quarzsand wesentlich stärker als in Feldboden. Die peripheren Wurzelteile wiesen in Quarzsand zumeist größere Populationsdichten auf als die in Samennähe befindlichen Wurzelteile. Der Zusatz des Neem-Präparates Rhakshak Gold führte *in vivo* weder zu einer signifikanten Erhöhung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* noch zu einer Aktivitätserhöhung. Die Gesamtkeimzahlen in Rhizosphäre und Substrat wurden durch die Anwendung von *Bacillus subtilis* nicht beeinflusst.

Die Aktivität von *Bacillus subtilis* in Rhizosphäre, Rhizoplane und Substrat war gering, der größte Teil der Keime lag versport vor. Die geringsten Versporungsgrade wurden in Quarzsand in der Rhizoplane sowie in Feldboden im Substrat festgestellt.

Die Applikation des Nutzbakteriums führte zu einem reduzierten Krankheitsbefall der Erbsenpflanzen mit *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani*. Die antifungale Wirkung kam in Feldboden und Aussaaterde wesentlich stärker zum Tragen als in Quarzsand.

Es war kein direkter Zusammenhang zwischen Populationsdichte der introduzierten Bakterien in Rhizosphäre und Substrat und deren phytoeffektiver sowie antifungaler Leistung erkennbar. Als Ursache dafür wird der hohe Anteil versporter Zellen in der *Bacillus subtilis*-Population angesehen.

Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Bedeutung des Besiedlungsverhaltens und der Aktivität von *Bacillus subtilis* für dessen phytoeffektive und antifungale Wirkung diskutiert.

Schlagworte:

Bacillus subtilis

Populationsdynamik

Aktivitätsdynamik

Biologischer Pflanzenschutz

ökologische Faktoren

Erbse

Abstract

Zimmer, Jens: **Population- and activity dynamics of the beneficial rhizobacterium *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn after introduction into natural systems of plant and soil**

The colonization of the plant root and the presence of physiologically active bacterial cells are basic conditions to obtain plant growth promotion and disease suppression by application of *Bacillus subtilis*. Studies of the population- and activity dynamics of the introduced bacteria were carried out to determine the influence of different soil types and ecological factors on colonization of plant roots by *Bacillus subtilis*. Pea plants (*Pisum sativum* L. cv. 'Boerdi') which were treated with these bacteria have been grown in three different types of substrate under controlled conditions in the climate chamber.

The population density of *Bacillus subtilis* was strongly dependend on the applied number of cfu (colony forming units). The use of potassium nitrate, sand or maize starche as carrier for the bacterial formulation did not affect the colonization behaviour.

The development of *Bacillus subtilis*-populations at the plant roots and in the substrate was significantly influenced by temperature. Higher temperatures during the trials resulted in larger population sizes of the introduced bacteria. The influence of temperature was much stronger in quartz sand compared with field soil. In most cases the colonization of the outer parts of the root near the root tip was better than the colonization of the root parts near the seed. The addition of the neem-extract Rakshak Gold did not have a significant influence on population density and activity of *Bacillus subtilis in vivo*. Nearly no effects of the bacterial treatments on the indigenous microflora could be found.

The physiological activity of *Bacillus subtilis* in the rhizosphere, on the root surface and in the substrate was low. The bacterial population consisted largely of spores. The lowest percentage of spores was determined directly on the root surface (in quartz sand) and in the substrate (in field soil) respectively.

The bacterial treatments led to a reduced disease severity on pea plants caused by *Phoma pinodella* and *Rhizoctonia solani*. The antifungal activity was higher in field soil and horticultural substrate compared with quartz sand.

There was no correlation between the population density of the introduced bacteria in rhizosphere and substrate and their plant growth promoting or antifungal effects. A possible reason for that is the high percentage of non-active cells within the population of *Bacillus subtilis*.

The results would be discussed towards the importance of population dynamics and activity of the rhizobacterium *Bacillus subtilis* for its plant growth and health promoting effects.

Keywords:

Bacillus subtilis

population dynamics

activity dynamics

biological control

ecological factors

pea

Gewidmet

meinem viel zu früh verstorbenen Vater, Herrn Dipl.-Ing.

Egon Zimmer (19.05.1942 – 22.11.2001)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Das Besiedlungsverhalten von <i>Bacillus subtilis</i> und anderer Rhizosphärebakterien	10
2.1	<i>Räumliche und zeitliche Verteilung</i>	10
2.2	<i>Einflussfaktoren</i>	12
2.2.1	Allgemein	12
2.2.2	Temperatur	14
2.2.3	Physiko-chemische Bodeneigenschaften und mikrobielle Konkurrenz	16
2.2.4	Eigenschaften der Interaktionspartner	18
2.3	<i>Zusammenhang zwischen Populationsdichte und Wirksamkeit</i>	21
3	Material und Methoden	23
3.1	<i>Charakterisierung der Versuchsorganismen</i>	23
3.1.1	Testpflanze Erbse (<i>Pisum sativum</i> L.)	23
3.1.2	Wurzelfäuleerreger <i>Phoma pinodella</i> (L.K.Jones) Morgan-Jones & Burch	23
3.1.3	Wurzelfäuleerreger <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	25
3.1.4	Nutzbakterium <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	27
3.2	<i>Charakterisierung der verwendeten Substrate</i>	28
3.2.1	Quarzsand	28
3.2.2	Feldboden und Einheitserde Typ Null	28
3.2.3	Aussaaterde	29
3.3	<i>Versuchsdesign</i>	30
3.3.1	Versuchsserie 1	30
3.3.2	Versuchsserie 2	33
3.3.3	Versuchsserie 3	34
3.3.4	Langzeitversuch	36

3.3.5	Einzelversuche zur Populations- und Aktivitätsdynamik von <i>Bacillus subtilis</i>	37
3.3.6	Komplexversuche	38
3.4	<i>Versuchsauswertung</i>	41
3.4.1	Erfassung von Wachstumsparametern der Testpflanzen	41
3.4.2	Ermittlung des Krankheitsbefalls der Testpflanzen	42
3.4.3	Reisolation der introduzierten <i>Bacillus subtilis</i> -Isolate	43
3.4.4	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	<i>Versuchsserie 1</i>	47
4.1.1	Besiedlungsverhalten von <i>Bacillus subtilis</i>	47
4.1.2	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf das Pflanzenwachstum	54
4.2	<i>Versuchsserie 2</i>	62
4.2.1	Besiedlungsverhalten von <i>Bacillus subtilis</i>	62
4.2.2	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf das Pflanzenwachstum	67
4.2.3	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen	73
4.3	<i>Versuchsserie 3</i>	74
4.3.1	Besiedlungsverhalten von <i>Bacillus subtilis</i>	74
4.3.2	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf das Pflanzenwachstum	81
4.3.3	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen	85
4.4	<i>Langzeitversuch</i>	87
4.4.1	Besiedlungsverhalten von <i>Bacillus subtilis</i>	87
4.4.2	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf das Pflanzenwachstum	90
4.4.3	Einfluss der <i>Bacillus subtilis</i> -Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen	91
4.5	<i>Einzelversuche zur Untersuchung von Populations- und Aktivitätsdynamik von Bacillus subtilis</i>	92

4.5.1	Populationsdynamik	92
4.5.2	Aktivitätsdynamik	99
4.6	<i>Komplexversuche</i>	101
4.6.1	Besiedlungsverhalten von <i>Bacillus subtilis</i>	101
4.6.2	Aktivität von <i>Bacillus subtilis</i>	107
4.6.3	Einfluss der Behandlungen auf das Pflanzenwachstum	110
4.6.4	Einfluss der Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen	114
5	Diskussion	119
6	Schlussfolgerungen	154
7	Zusammenfassung	156
	Literaturverzeichnis	159
	Anhang	185

verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
B	Boden-(Substrat-)behandlung
cfu	Colony forming units (koloniebildende Einheiten)
CMV	Cucumber mosaic virus (Gurkenmosaik-Virus)
cv.	Cultivar
d	Tag(e)
FM	Frischmasse
f. sp.	Forma specialis
FZB	Forschungszentrum für Biotechnologie
GD	Grenzdifferenz
GWH	Gewächshaus
h	Stunde(n)
HSD	Grenzdifferenz beim TUKEY-Test (highest significant difference)
Ki	Krankheitsindex
KK	Klimakammer (Phytotron)
klx	Kilolux
KZ	Keimzahl
min	Minuten
n.e.	nicht ermittelt
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCNB	Pentachloronitrobenzene

PDA	Potato Dextrose Agar (Kartoffeldextrose-Agar)
PDB	Potato Dextrose Broth (Kartoffeldextrose-Flüssigmedium)
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Pflanzenwachstum-fördernde Rhizobakterien)
ppm	Teile einer Million (parts per million), 1 ppm = 1 mg / l bzw. 1 ml / 1000 l
pv.	Pathovar
RG	Rakshak Gold (Handelsbezeichnung des verwendeten Neem-Präparates)
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Saatgutbehandlung
S+B	Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung
SNA	Slight Nutrient Agar
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmasse
var.	Varietas

1 Einleitung

Pflanzenschutzmaßnahmen sind zur Erhaltung der Leistungsfähigkeit von Kulturpflanzen in Landwirtschaft und Gartenbau unabdingbar. Sie tragen wesentlich zum Erzielen stabiler und hoher Erträge sowie hoher Qualität landwirtschaftlicher und gärtnerischer Erzeugnisse bei, was für die Wettbewerbsfähigkeit der Betriebe im Agrarsektor von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Die Notwendigkeit einer nachhaltigen Landbewirtschaftung, Indikationslücken speziell im Bereich der Sonderkulturen sowie gestiegenes Umweltbewusstsein in der Bevölkerung haben zu einer verstärkten Suche nach Möglichkeiten zur ökologisch orientierten Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten und Schädlingen geführt. Eine solche Verfahrensweise stellt der biologische und biotechnische Pflanzenschutz dar, wobei darunter Verfahren verstanden werden, „die mit Hilfe biotischer Agenzien oder Manipulationen Erregerpopulationen dezimieren, ihre parasitische Leistungsfähigkeit beeinträchtigen oder deren Ziel es ist, durch Erhöhung der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen den Befall mit Schaderregern zu reduzieren“ (SCHÖNBECK 1984). Dabei sind biologische Verfahren des Pflanzenschutzes nicht nur im ökologischen Anbau von Bedeutung, sondern sind außerdem wesentlicher Bestandteil in der integrierten Produktion.

Eines dieser biologischen Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten ist die Anwendung mikrobieller Gegenspieler. Der Antagonismus einiger Mikroorganismen zueinander ist schon sehr lange bekannt. Bereits im Jahre 1874 wies W. ROBERTS das antagonistische Verhalten von Bakterien gegenüber dem Pilz *Penicillium glaucum* in Flüssigkultur nach (BAKER 1987). In den 20er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gab es erste Anstrengungen, solche natürlichen Gegenspieler von Krankheitserregern nutzbar zu machen (COOK & BAKER 1983). Insbesondere in den letzten 30 Jahren hat es eine nahezu unüberschaubare Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten gegeben, die sich mit der Suche nach möglichen Antagonisten gegen die verschiedensten Pflanzenkrankheitserreger beschäftigt haben. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei ebenso auf pilzliche wie auch auf bakterielle Gegenspieler (BOCHOW 1989). Bei den Bakterien sind es sowohl gram-negative als auch gram-positive und Actinomyceten, die für eine Nutzung in biologischen Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten in Frage kommen (KOCH 1996).

Eine intensive Suche nach nutzbaren Gegenspielern von phytopathogenen Mikroorganismen findet seit Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts statt (BAKER 1987). BROADBENT et al. (1971) nennen als mögliche Antagonisten gegen bodenbürtige, pilzliche Krankheitserreger fluoreszierende Pseudomonaden und eine ganze Reihe Arten der Gattung *Bacillus*, darunter *Bacillus subtilis*. BROWN (1974) erwähnt neben weiteren Bakteriengattungen *Bacillus*-Arten als „Bio-Fertilizer“.

Mikrobielle Antagonisten lassen sich umso effektiver einsetzen, je mehr zu ihrer Wirkungsweise bekannt ist. Aus diesem Grunde konzentrieren sich Untersuchungen zu deren Nutzbarmachung nicht nur auf die Suche nach solchen potenziellen Antagonisten, sondern auch auf ihre Lebensweise und ihren Wirkmechanismus. Die Wirkungsweise solcher mikrobieller Gegenspieler ist auf die drei Grundmechanismen Konkurrenz, Parasitismus und Antibiose zurückzuführen (KOCH 1996).

Einige Bakterienarten verfügen neben den genannten Grundmechanismen einer direkten Beeinflussung des Schadorganismus über die Möglichkeit, durch Interaktion mit der Pflanzenwurzel und Produktion bestimmter Substanzen wie Indol-3-Essigsäure und Cytokinin-ähnlichen Verbindungen sowie durch Verminderung der Ethylengehalte das Pflanzenwachstum zu fördern (BUCHENAUER 1998).

Für solche Bakterien, die in der Lage sind, die Pflanzenwurzel aktiv und passiv zu besiedeln und sich dort zu vermehren, wurde der Begriff Rhizobakterien geprägt. BRÜCKNER (1998) nennt weitere wichtige Voraussetzungen für die Kontrolle von bodenbürtigen Krankheitserregern, die von Rhizosphärebakterien erfüllt werden:

- Ansammlung bzw. Synthese von Nährstoffen und wachstumsregulierenden Stoffen, welche über eine Förderung der Gesamtkonstitution der Pflanze deren Abwehrkraft erhöhen,
- Verhinderung einer möglichen Schadwirkung des Pathogens auf die Pflanze durch Abbau von phytotoxischen Stoffen (Elicitoren),
- Induktion einer pflanzlichen Resistenz durch Ausscheidung schwach phytotoxischer Stoffe,
- Ausscheidung entwicklungshemmender bzw. abtötender Stoffe gegenüber dem Pathogen (Antibiose), wobei es sich hierbei meist um Antibiotika, Exoenzyme oder flüchtige HCN-Verbindungen handelt,

- Ausscheidung von Siderophoren und damit Induktion eines Eisenmangels für das Pathogen,
- Konkurrenz um Nährstoffe.

IDRIS AHMED (2002) nennt mit der Aufschlüsselung von Phosphor für die Pflanze durch extrazelluläre Phytaseaktivität einiger *Bacillus subtilis* / *amyloliquefaciens*-Stämme noch einen anderen wichtigen Mechanismus, der für die Stimulation des Pflanzenwachstums durch Rhizosphärebakterien von Bedeutung ist.

1978 wurde der Begriff Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) geprägt (KLOPPER & SCHROTH 1978). Er wird für Bakterienstämme verwendet, die Wachstum und Vitalität von Kulturpflanzen fördern und mit deren Hilfe zum Teil erhebliche Ertragssteigerungen erreicht wurden (WELLER 1988). Sie erfüllen eine oder eine Kombination mehrerer der zuvor genannten Voraussetzungen. Der Begriff PGPR wurde zunächst für einige Stämme von *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida* verwendet (WELLER 1988), ist heute aber auch für andere Pflanzenwachstum-fördernde Rhizobakterien, darunter *Bacillus subtilis*, üblich.

Bacillus spp. besitzen einen großen Vorteil in der praktischen Handhabung, da sie außerordentlich widerstandsfähige Endosporen bilden, die zu einem hohen Grad hitze- und trockenbeständig sind (WELLER 1988, SINCLAIR 1989, OSBURN et al. 1995). Den Untersuchungen von BROADBENT et al. (1971) zufolge können in der Sporenform sowohl Temperaturen unter dem Gefrierpunkt als auch Hitze bis zu 90 °C überstanden werden. Des Weiteren zeichnen sich die Endosporen von *Bacillus*-Arten durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemikalien und anderen letalen Einflussfaktoren wie z.B. der UV-Strahlung aus (SILVA et al. 1978, SOUSA et al. 1978, BAYLISS et al. 1981, SINCLAIR 1989, SCHRÖDER 1991). Die Fähigkeit zur Bildung solcher Endosporen gewährleistet zur Kommerzialisierung eine gute Formulierbarkeit von Pflanzenschutz- bzw. Pflanzenstärkungsmitteln auf der Basis von *Bacillus subtilis* und anderer Arten dieser Gattung wegen der langen Haltbarkeit und unkomplizierter Lagerbedingungen für solche Produkte (MCINTYRE & PRESS 1991, ROSALL & MCKNIGHT 1991, BOCHOW 1995, SCHMIEDEKNECHT et al. 1998). Diese Tatsache ist ein wesentlicher Grund dafür, dass sich insbesondere praxisorientierte Forschung der letzten Jahre nicht nur auf die Gattung *Pseudomonas*, sondern auch auf *Bacillus*-Arten, insbesondere *Bacillus subtilis* konzentrierte, obwohl fluoreszierende Pseudomonaden

vielfach als potentere und konkurrenzfähigere Rhizosphärebakterien im Vergleich zu *Bacillus*-Arten angesehen werden (KIM et al. 1997a, KIM et al. 1997b, KILIAN et al. 2000).

Bereits 1983 wurde der von BROADBENT et al. (1971) isolierte Stamm *Bacillus subtilis* A 13 als kommerzielles Produkt unter dem Namen QUANTUM-4000 angeboten. 'Kodiak' ist ein Präparat auf der Basis des *Bacillus subtilis*-Stammes GB-03 (MAHAFFEE & BACKMAN 1993). Seit 1997 ist ein von der FZB Biotechnik GmbH isolierter *Bacillus subtilis*-Stamm als biologisches Pflanzenstärkungsmittel auf dem Markt, zunächst unter dem Handelsnamen Rhizo-Plus, später unter der Stammbezeichnung FZB24[®].

Antagonistische Effekte von *Bacillus subtilis* gegen eine Reihe pilzlicher und bakterieller Schaderreger konnten mehrfach nachgewiesen werden. Insbesondere konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Unterdrückung wichtiger pilzlicher boden- und samenbürtiger Krankheitserreger wie *Alternaria radicina*, *Fusarium* spp., *Leptosphaeria maculans*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Verticillium dahliae* (YEHIA et al. 1982, GAIKWAD et al. 1987, WELLER 1988, HENTSCHEL 1991, GANTCHEVA 1993, BERG & BALLIN 1994, BRANNEN 1995, SCHMIEDEKNECHT et al. 1996, SCHMIEDEKNECHT et al. 1997, KIM et al. 1997a, GROSCHE et al. 1999, ISSOUFOU 2000, SCHMIEDEKNECHT et al. 2001, HANG et al. 2001, ZHAO et al. 2001, NGUYEN et al. 2002). Beispiele für bakterielle Schaderreger, gegen die *Bacillus subtilis* bereits erfolgreich eingesetzt wurde, sind *Streptomyces scabies*, *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* und *Pseudomonas solanacearum* an Kartoffeln (SCHMIEDEKNECHT et al. 1996, SUNAINA et al. 1997, ABDEL-ALIM et al. 2001, ABDEL-ALIM et al. 2002) sowie *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis* (HOODA et al. 1995). Doch damit ist das Leistungspotenzial dieses Bakteriums nicht erschöpft. So testeten LEIBINGER et al. (1997) *Bacillus subtilis* in Kombination mit anderen Mikroorganismen erfolgreich gegen pilzliche Nacherntekrankheitserreger an Apfel. LAUX & ZELLER (2000) sowie LAUX & ZELLER (2002) erreichten bei Versuchen zur Bekämpfung von Feuerbrand-Blüteninfektionen an Apfel und Birne durch Behandlung mit *Bacillus subtilis* einen Wirkungsgrad von 52 % bis 71 %.

Ebenso wird von phytoeffektiven Wirkungen von *Bacillus subtilis* berichtet, die in Form von Wachstumsförderung und höheren Erträgen der behandelten Kulturpflanzen

messbar sind (CHAMBERS & MILLINGTON 1974, BROADBENT et al. 1977, YEHIA et al. 1982, REDDY & RAHE 1989a, REDDY & RAHE 1989b, GANTCHEVA 1993, BRANNEN 1995, SCHMIEDEKNECHT et al. 1996, LEHMANN 1999, ISSOUFOU 2000, SCHMIEDEKNECHT et al. 2001, KREBS 2002). Diese sind im Gegensatz zu dessen antifungalen und antibakteriellen Aktivitäten weitgehend unspezifisch, indem sie nicht auf spezielle Pflanzenarten beschränkt sind (KREBS et al. 1998). Die bisherige Suche nach bakteriellen Antagonisten gegen diverse Phytopathogene konzentrierte sich sehr stark auf die direkte antibiotische Wirksamkeit gegen bestimmte Schaderreger. Da die Wirkung über die Pflanze unspezifischer ist und die Kulturpflanze mit ihrer Ertragsleistung im Mittelpunkt des Interesses des Anbauers steht, sollte die Wirkung auf die bzw. mit der Pflanze zum Prüffaktor bei der Suche nach geeigneten *Bacillus subtilis*-Isolaten werden.

Die Wirkung nicht nur direkt gegen einen Schadorganismus, sondern auch über die Pflanze ist dafür verantwortlich, dass mit einer Introduktion des Nutzbakteriums auch in Abwesenheit von Phytopathogenen eine Erhöhung der Biomasseproduktion der Kulturpflanze, mit der oftmals eine Ertragserhöhung einhergeht, sowie eine größere Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren erreicht werden kann. So stellte TIGGES (1998) eine Minderung der negativen Auswirkungen von Salzstress auf Bohnenpflanzen in Flüssigkultur durch Behandlung mit *Bacillus subtilis* fest. BOCHOW et al. (2001) gelang bei unter Salzstress leidenden Auberginen- und Paprikapflanzen mit einer Applikation von *Bacillus subtilis* FZB24[®] eine Kompensation des Stresses, die sich in einer Ertragssteigerung um ein Vielfaches gegenüber unbehandelten Pflanzen niederschlug. ALEMAYEHU & BOCHOW (1996) berichten von einer verminderten Toxinempfindlichkeit einer Tomatenzellsuspensionskultur durch Zugabe von Kulturfiltraten von *Bacillus subtilis* FZB-G. DOLEJ & BOCHOW (1996) erreichten mit Kulturfiltraten von *Bacillus subtilis* eine Toleranzinduktion in Tomatenpflanzen gegenüber dem phytopathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. SEIDEL (1997) konnte mit Ausfällungen des aufgereinigten Kulturfiltrates von *Bacillus subtilis* B50 Toleranzreaktionen in Gerste gegenüber Echtem Mehltau beobachten. AHMED & BOCHOW (1997) wiesen Toleranzinduktion in Tomatenpflanzen gegenüber *Meloidogyne*-Befall durch Kulturfiltrate von *Bacillus subtilis* FZB C nach. Obgleich einige Kulturfiltratbehandlungen, insbesondere von der Übergangsphase und der stationären Phase der Fermentation, den Nematodenbefall des Wurzelsystems förderten,

kam es zu keiner weiteren Verminderung der Biomasseproduktion der Tomatenpflanzen gegenüber der unbehandelten, befallenen Kontrolle, teilweise wurde sogar Wachstumsförderung durch die Behandlungen beobachtet. Die Pflanzen waren also durch die Kulturfiltrat-Behandlungen besser in der Lage, die durch den Nematoden-Befall verursachten Schäden zu kompensieren. Eine Reduktion des Wurzelbefalls von Kartoffeln mit dem Zystennematoden *Globodera pallida* ist auch durch Behandlungen mit dem Rhizosphärebakterium *Bacillus sphaericus* bekannt (HASKY et al. 1996).

Weiterhin berichten mehrere Autoren von der Induktion systemischer Resistenz durch *Bacillus subtilis*. So gelang es MAISS (1987) durch Applikation zellfreier Kulturfiltrate des Nutzbakteriums, in Gerste und Gurken eine Resistenz gegenüber Viren zu induzieren. RAUPACH & KLOPPER (1996) berichten von Induktion PGPR-vermittelter Resistenz in Gurkenpflanzen durch Anwendung von *Bacillus subtilis*. Sie konnten nach Behandlung mit dem Bakterium und darauf folgender CMV-Infektion eine verminderte Krankheitsintensität und teilweise ein völliges Ausbleiben der Symptomausprägung beobachten. DUGASSA GOBENA (1990) schloss auf Grund der von ihm gewählten Versuchsmethodik direkte fungistatische oder fungizide Wirkungen von *Bacillus subtilis* T99 und *Streptomyces flavescens* G 1111 gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* an Tomatenjungpflanzen aus und erklärte die krankheitsunterdrückende Wirkung der Antagonisten mit Resistenzinduktion. GUPTA et al. (2000) konnten mit Kulturfiltraten aus der Übergangsphase der Fermentation des *Bacillus subtilis*-Stammes FZB G in Tomatensämlingen systemische Resistenz gegenüber dem phytopathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* induzieren. ISSOUFOU (2000) fand bei seinen Untersuchungen keine Korrelation zwischen antibiotischer Aktivität von *Bacillus subtilis* *in vitro* und krankheitsunterdrückender Wirkung *in vivo*. Auch er vermutete daher, dass die antagonistische Wirksamkeit des Nutzbakteriums *in vivo* wesentlich auf Resistenzinduktion in den behandelten Pflanzen zurückgeht.

Zur Erhöhung der Wirkungssicherheit von *Bacillus subtilis* gegen diverse Krankheitserreger wurde versucht, das Nutzbakterium in Kombination mit anderen PGPR einzusetzen. Dadurch können in bestimmtem Maß durch Umweltbedingungen verursachte Wirkungsminderungen und eine zu hohe Spezifität eines einzelnen Antagonisten ausgeglichen und außerdem eine größere ökologische Stabilität erreicht werden (METZLER 1991). Voraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz solcher

„Antagonistencocktails“ ist, dass sich *Bacillus subtilis* und die Kombinationspartner nicht antagonistisch zueinander verhalten. Eine solche kompatible Kombination ist beispielweise die von *Bacillus subtilis* und *Talaromyces flavus* zur Unterdrückung von *Verticillium dahliae* (NAGTZAAM et al. 1998). Die gemeinsame Applikation beider Mikroorganismen wirkte sich nicht negativ auf deren Populationsdichte aus, die von *Bacillus subtilis* war sogar höher als bei alleiniger Anwendung. Trotz Halbierung des Inokulums beider Kombinationspartner wurde ein annähernd gleicher Bekämpfungserfolg erreicht. Von guten Ergebnissen und teilweise synergistischen Effekten durch die Kombination von *Bacillus subtilis* mit anderen mikrobiellen Nutzorganismen berichten SRIDHAR et al. (1993), SANKAR & JEYARAJAN (1996), ROSENKRANZ (1996) sowie SCHMIDT et al. (2002). Da zum Erreichen der gewünschten Effekte, wie Unterdrückung von Phytopathogenen und Wachstumsförderung der Kulturpflanzen, immer eine bestimmte Mindestkeimzahl von Rhizobakterien erforderlich ist, ist es auch von Interesse, sie durch Zugabe bestimmter chemischer Agenzien zu fördern. In diesem Zusammenhang besteht eine weitere Möglichkeit in der Anwendung von *Bacillus subtilis* in Verbindung mit biologischen oder synthetischen Pflanzenschutzmitteln. Auch in diesem Fall ist die Verträglichkeit des Nutzbakteriums mit der eingesetzten Wirkstoffkonzentration des Pflanzenschutzmittels Voraussetzung für den Erfolg einer solchen Behandlung. Dass *Bacillus subtilis* gut verträglich mit Pflanzenschutzmitteln in gängigen Anwendungskonzentrationen sein kann, lassen die Versuche von MAHAFFEE & BACKMAN (1993) erkennen. Sie stellten fest, dass eine Behandlung von Baumwollsaamen mit Metalaxyl und PCNB (Pentachlornitrobenzen) zu keiner Reduktion der Spermosphärenbesiedlung durch *Bacillus subtilis* GB-03 führte, sondern dass die Keimzahl des Antagonisten an fungizidbehandeltem Saatgut um bis zu einer Zehnerpotenz über der an unbehandeltem Saatgut lag. Ein Fungizid kann Schutz vor spezifischen pilzlichen Krankheitserregern bieten, wenn die Umweltbedingungen ungünstig für die Entwicklung und Aktivität des mikrobiellen Nutzorganismus sind (LIFSHITZ et al. 1985, HWANG & CHAKRAVARTY 1992). LIFSHITZ et al. (1985) und CHAKRAVARTY et al. (1990) berichten von der Effizienz solcher Kombinationen von nützlichen Mikroorganismen mit Fungiziden. HWANG & CHAKRAVARTY (1992) erreichten einen synergistischen Effekt durch Kombination von *Bacillus subtilis* mit dem Fungizid Anchor[®] (Carbathiin + Thiram) gegen *Rhizoctonia solani* an Erbsen. Von vielversprechenden Ergebnissen durch die gemeinsame Applikation von *Bacillus subtilis* mit Zineb berichten OBIEGLO et al. (1990) und KREBS et al. (1993). Additive

Wirkungen durch Kombination des Nutzbakteriums mit den fungiziden Wirkstoffen Captan, Vinclozolin, Iprodion, Metiram und Prochloraz in stark reduzierten Aufwandmengen beobachtete JAMAL (1993).

Trotz vielfach guter Erfolge mit dem Einsatz nützlicher Rhizosphärebakterien wie fluoreszierenden Pseudomonaden und *Bacillus subtilis* gegen bodenbürtige pilzliche und bakterielle Schaderreger wird immer wieder auch von einer nicht ausreichenden bzw. unbeständigen Wirkung berichtet (WELLER 1988, POSTMA & VAN VEEN 1991, LEMANCEAU & ALABOUVETTE 1993, RAAIJMAKERS et al. 1995, THOMPSON et al. 1996). Einer der Gründe für die nicht immer zuverlässige Wirkung antagonistischer Rhizobakterien liegt in der ineffizienten Wurzelbesiedlung durch die introduzierten Mikroorganismen (SCHIPPERS et al. 1987, WELLER 1988, BULL et al. 1991). Voraussetzung für eine allgemeine Akzeptanz von biologischen Pflanzenschutz- bzw. Pflanzenstärkungsmitteln bei Landwirten und Gärtnern und damit für den kommerziellen Erfolg dieser Produkte ist jedoch eine Wirkungssicherheit, die nicht hinter der von konventionellen chemischen Pflanzenschutzmitteln zurücksteht. Um das absichern zu können, ist eine detaillierte Kenntnis der Wirkungsweise von Präparaten auf der Basis des Nutzbakteriums *Bacillus subtilis* erforderlich. Folgende Grundvoraussetzungen müssen für das Zustandekommen phytoeffektiver und Pathogen unterdrückender Effekte durch *Bacillus subtilis* gegeben sein:

- a) Es muss eine Besiedlung der Pflanzenwurzel durch das Bakterium erfolgen.
- b) Es müssen ausreichend Bakterienzellen aktiv sein, d.h. in vegetativer, nicht versporter Form vorliegen.
- c) Die Bakterienzellen müssen phytoeffektiv wirksame sowie antifungale bzw. antibakterielle Substanzen produzieren. Dazu gehören unterschiedlichste Stoffe, die den Phytohormonhaushalt der Pflanze beeinflussen, z.B. solche, die der Pflanze als Nährstoff dienen oder Nährstoffe aus dem Boden pflanzenverfügbar machen, sowie Antibiotika, Enzyme und Siderophoren, aber auch Resistenz- und Toleranzinduktoren.

Die vorliegende Arbeit ist den ersten beiden Voraussetzungen gewidmet. Ziel der populations- und aktivitätsdynamischen Untersuchungen ist die detaillierte Ergründung des Besiedlungsverhaltens des Nutzbakteriums *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von verschiedenen ökologischen und edaphischen Faktoren. Des Weiteren soll eine

Bewertung einzelner biotischer und abiotischer Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Populationsdichte des Bakteriums vorgenommen werden. Die Aktivität von *Bacillus subtilis* wird sowohl direkt über die Ermittlung des Versporungsgrades als auch indirekt über den Einfluss der Bakterienbehandlungen auf Pflanzenwachstum und Krankheitsbefall der Modellpflanzen betrachtet. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen soll es möglich sein, Rückschlüsse auf die Einsatzbedingungen des Nutzbakteriums unter praktischen Bedingungen in Landwirtschaft und Gartenbau zu ziehen und die Anwendungsempfehlungen für das Pflanzenstärkungsmittel FZB24® auf der Basis von *Bacillus subtilis* zu konkretisieren.

2 Das Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis* und anderer Rhizosphärebakterien

2.1 Räumliche und zeitliche Verteilung

Dass PGPR in der beschriebenen Weise die Wurzel besiedeln müssen, um in der Lage zu sein, das Pflanzenwachstum zu fördern, ist heute allgemein bekannt (SUSLOW 1982, LOPER et al. 1985, LIDDELL & PARKE 1989, LUGTENBERG et al. 1991). Die Besiedlung der Pflanzenwurzel als Grundlage für das Zustandekommen einer Interaktion zwischen introduzierten Rhizobakterien und der Kulturpflanze wird von WELLER & THOMASHOW (1994) definiert als Prozess, bei dem über Samen oder vegetative Pflanzenteile applizierte Bakterien sich entlang der im Boden wachsenden Wurzeln verteilen, sich vermehren und bei Anwesenheit der autochthonen Mikroflora mehrere Wochen überleben. Dieser Prozess schließt ein die Besiedlung der Rhizosphäre, der Wurzeloberfläche und ggf. das Eindringen in die Wurzel. Auch die antagonistische Wirkung nützlicher Rhizosphärebakterien ist von deren Etablierung am Pflanzenmaterial oder im Boden abhängig und davon, dass über einen längeren Zeitraum eine ausreichende Populationsdichte erhalten bleibt (SUSLOW 1982, XU & GROSS 1986, WELLER 1988). Um als Antagonisten effektiv zu sein, müssen die introduzierten Bakterien (in Abhängigkeit von der verwendeten Art) in der Rhizosphäre eine bestimmte Mindest-Keimzahl erreichen (TORKEWITZ & LAM 1991, LIU & SINCLAIR 1991). Populationsdynamische Untersuchungen sind daher für das Verständnis der Wirkungsweise nützlicher Rhizosphärebakterien und damit für das Auffinden optimaler Anwendungstechnologien von ausschlaggebender Bedeutung (FREIER et al. 1990a). Sie geben Aufschluss über Etablierungsfähigkeit, Persistenz, Tiefeninfiltration sowie Konkurrenzverhalten gegenüber der autochthonen Bodenmikroflora (FREIER et al. 1990b, LIU & SINCLAIR 1992).

Im Vergleich zu *Bacillus subtilis* und anderen gram-positiven Bakterien existieren detailliertere populationsdynamische Untersuchungen zu fluoreszierenden Pseudomonaden (LIU & SINCLAIR 1993). Es ist aus diesem Grund notwendig, auch auf Erfahrungen, die mit diesen und weiteren PGPR gemacht wurden, zurückzugreifen.

Von besonderem Interesse sind Details zur räumlichen und zeitlichen Verteilung sowie zur Überlebensfähigkeit der Nutzbakterien nach Applikation. So stellte WELLER (1983)

eine Verteilung von *Pseudomonas fluorescens* 2-79 auf der gesamten Wurzellänge von Winterweizen fest, einschließlich der Wurzelspitzennähe. Der gleiche Autor hob jedoch hervor, dass die oberen Wurzelabschnitte in Samennähe besser besiedelt werden als tiefer gelegene (WELLER 1986). Ähnliche Erfahrungen machten BAHME & SCHROTH (1987) bei ihren Versuchen zur räumlichen Verteilung eines introduzierten *Pseudomonas fluorescens*-Stammes an Kartoffeln. Auch RYDER & BORRETT (1991) fanden an Weizenpflanzen, die über eine Saatgutapplikation mit *Pseudomonas corrugata* behandelt worden waren, die höchsten Populationsdichten des eingebrachten Bakteriums im Bereich am und um den Samen bzw. dessen Überresten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen SCHMIDT et al. (2000b). Sie fanden die größte Populationsdichte und die größte Aktivität von zuvor über Saatgutbehandlung eingebrachten Stämmen von *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas corrugata* am Hypokotyl und den oberen Wurzelteilen von Zuckerrübensämlingen. Demgegenüber sagte BOCHOW (1994) aus, dass für *Bacillus subtilis* der aktiv wachsende Teil der Wurzel (Wurzelspitze, Stolonen) bevorzugte Besiedlungszone für die Bakterien sei. MALIES (1995) beobachtete in erdeloser Tomatenkultur zunächst eine stärkere Besiedlung der oberen Wurzelregion durch *Bacillus subtilis*, jedoch wurden die Unterschiede der Populationsdichten in den einzelnen Wurzelregionen mit zunehmender Versuchsdauer geringer. Dieser Fakt wird durch die Ergebnisse von ALBRECHT (1995) bei populationsdynamischen Untersuchungen von *Bacillus subtilis* an Radieschen in Erdsubstraten untermauert. FREIER et al. (1990a) fanden über eine sechsmonatige Versuchszeit einen relativ stabilen Titer von *Bacillus subtilis* T99 in Erdsubstrat und schlossen daraus auf eine hohe Konkurrenzfähigkeit des introduzierten Nutzbakteriums. LIU & SINCLAIR (1992) befassten sich mit der Populationsdynamik eines applizierten *Bacillus megaterium*-Stammes an Sojabohnen. Sie stellten eine schnelle Etablierung der introduzierten Bakterien, eine hohe Affinität zur Pflanzenwurzel, eine hohe Konkurrenzfähigkeit gegenüber der autochthonen Bodenmikroflora sowie eine gute und dauerhafte Besiedlung der Pflanzenwurzeln und der Rhizosphäre fest. Zudem beobachteten die Autoren eine stärkere vertikale als horizontale Ausbreitung von *Bacillus megaterium* im Boden. Während die Populationsdichte dieses Bakteriums zum Ende der Vegetationszeit in den oberen 10 cm des Bodens deutlich zurückging, blieb sie in tieferen Bodenschichten (20 cm – 30 cm) relativ konstant. ALBRECHT (1995) und MALIES (1995) stellten bei populationsdynamischen Versuchen mit *Bacillus subtilis* eine mit fortschreitender Zeitdauer abnehmende Populationsdichte des introduzierten

Bakteriums fest. MALIES (1995) begründet das mit der schwachen Konkurrenzkraft von *Bacillus subtilis* und der Tatsache, dass diese Art nicht zu den ausgesprochenen Rhizosphärebakterien gehört. KLOEPPER (1996) äußerte zur Überlebensfähigkeit introduzierter PGPR im Allgemeinen, dass ihre Population an den Pflanzenwurzeln während der Vegetationsperiode stetig absinkt und nach der Ernte nicht mehr im Boden nachweisbar ist. Grund dafür ist die enge Bindung der Bakterien an die Pflanzenwurzel. Lediglich einige sporenbildende Bakterien seien in der Lage, längere Zeit ohne Vorhandensein der Wurzel zu überdauern. Solche Sporenbildner sind *Bacillus* spp. und, wie bereits beschrieben, konnten LIU & SINCLAIR (1992) das Nutzbakterium *Bacillus megaterium* ohne Wiederholung der Applikation über mehr als ein Jahr im Boden nachweisen. So könnten gerade mit *Bacillus*-Arten besonders nachhaltige Effekte im Hinblick auf Pathogenunterdrückung bzw. Phytoeffektivität erzielt werden.

2.2 Einflussfaktoren

2.2.1 Allgemein

Die räumliche und zeitliche Verteilung von PGPR an Pflanzenmaterial und im Boden ist von einem Komplex **ökologischer und edaphischer Faktoren** abhängig, so von

- der *Temperatur* (WELLER & COOK 1983, HOWIE & ECHANDI 1983, LOPER et al. 1985, GUPTA & UTKHEDE 1986, DAVIES & WHITBREAD 1989, REDDY & RAHE 1989a, MATTAR & DIGAT 1991, BEAUCHAMP et al. 1991, TEDLA & STANGHELLINI 1992, GANTCHEVA 1993, BOCHOW & GANTCHEVA 1995, KILIAN et al. 1998, SCHMIDT et al. 2000a),
- der *Bodenfeuchte* (BURR et al. 1978, HOWIE & ECHANDI 1983, DUPLER & BAKER 1984, CAMPBELL & CLOR 1985, WEST et al. 1985, REDDY & RAHE 1989a, BOCHOW & GANTCHEVA 1995, KILIAN et al. 1998),
- dem *pH-Wert* des Bodens (ROSENZWEIG & STOTZKY 1979, HOWIE & ECHANDI 1983, WEST et al. 1985, YUEN et al. 1985, GUPTA & UTKHEDE 1986, REDDY & RAHE 1989a, OWNLEY et al. 1991, SCHMIDT et al. 2000a),
- dem *Tongehalt des Bodens* (ROSENZWEIG & STOTZKY 1979, CAMPBELL 1983, CAMPBELL & EPHGRAVE 1983, OWNLEY et al. 1991),

- dem *Nährstoffgehalt des Bodens* bzw. der *Nährstoffverfügbarkeit im Boden* (OWNLEY et al. 1991, KILIAN et al. 1998) sowie weiteren physikalischen und chemischen Bodeneigenschaften,
- der *autochthonen Mikroflora* (HIRTE 1977, WELLER 1983, WEST et al. 1985, DAVIES & WHITBREAD 1989, POSTMA & VAN VEEN 1991, BOCHOW 1994, BOCHOW & GANTCHEVA 1995).

Es ist jedoch nicht ausreichend, als Einflussfaktoren für die Populations- und Aktivitätsdynamik introduzierter Bakterienisolate lediglich äußere Bedingungen zu betrachten. Ebenso bedeutungsvoll sind **Eigenschaften der Interaktionspartner** – also der Kulturpflanze, des Pathogens und des introduzierten Nutzbakteriums – sowie Art und Weise der Applikation der eingesetzten PGPR. Entscheidende Faktoren sind dabei:

(a) bei der Kulturpflanze

- genetisch fixierte Eigenschaften der jeweiligen Pflanzenart und –sorte, insbesondere Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber bestimmten Schadorganismen,
- physiko-chemische Beschaffenheit der Samen- bzw. Wurzeloberfläche,
- Zusammensetzung der Wurzelexsudate,
- Prädisposition gegenüber Pathogenen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium.

(b) beim Pathogen

- genetisch fixierte Eigenschaften, insbesondere Virulenz,
- Populationsdichte und räumliche Verteilung im jeweiligen Medium.

(c) beim Nutzorganismus

- genetisch fixierte Eigenschaften des eingebrachten Bakterienisolats,
- Affinität zur Pflanzenwurzel,
- applizierte Keimzahl,
- Formulierung, Trägerstoff,
- Applikationstechnik (Saatgut-, Wurzel- oder Substratbehandlung; Tauchen, Besprühen oder Stäuben),

- Applikationszeitpunkt, bezogen auf das jeweilige Entwicklungsstadium von Kulturpflanze und Pathogen.

Um die Einsatzbedingungen für nützliche Rhizobakterien genauer definieren zu können, ist es erforderlich, einzelne ökologische und edaphische Faktoren sowie Eigenschaften der Interaktionspartner hinsichtlich ihres Einflusses auf Populationsdynamik und Aktivität des introduzierten Mikroorganismus zu wichten und günstige Bedingungen für die Nutzbakterien herauszustellen.

2.2.2 Temperatur

Von vielen Autoren wird die Temperatur für einen bedeutenden abiotischen Faktor gehalten, der sich unmittelbar auf die Populationsdichten von Mikroorganismen auswirkt. Nach WELLER & THOMASHOW (1994) liegen die Temperaturoptima vieler PGPR *in vitro* bei über 25 °C, während die Wurzelbesiedlung bei unter 20 °C am größten ist. LOPER et al. (1985) kamen zu dem Ergebnis, dass die Wurzelbesiedlung bei Kartoffeln durch zwei verschiedene Isolate fluoreszierender *Pseudomonaden* bei Temperaturen von 12 °C bzw. 18 °C am besten war, obwohl die jeweiligen Temperaturoptima *in vitro* 28 °C bzw. 30 °C betrugen. Die Differenz in den Temperaturansprüchen *in vitro* und *in vivo* wurde auch von PARKE (1991) angesprochen. GUTTERSON et al. (1990) stellten fest, dass der Stamm *Pseudomonas fluorescens* Hv37a Baumwollwurzeln bei Temperaturen von 16 °C und 20 °C gut besiedelte, während bei 24 °C eine 100mal niedrigere Populationsdichte ermittelt wurde. SEONG et al. (1991) beobachteten bei *Pseudomonas fluorescens* ANP15 bei 18 °C eine bessere Wurzelbesiedlung als bei 30 °C. Von einer höheren Überlebensrate von *Pseudomonas fluorescens* 88W1 in Boden bei 5 °C und 15 °C im Vergleich zu 25 °C berichten auch VANDENHOVE et al. (1991). DAVIES & WHITBREAD (1989) ermittelten ein Ansteigen der Populationsdichte von introduzierten *Pseudomonaden* in der Rhizosphäre von Radieschen bei Temperaturen zwischen 14 °C und 22 °C. Eine mit steigender Temperatur abnehmende Wurzelbesiedlung durch Lux-Gen-markierte *Pseudomonaden* beobachteten BEAUCHAMP et al. (1991) bei den Temperaturstufen 12 °C, 20 °C und 28 °C, wobei sich die Populationsdichte der autochthonen Bakterienflora als weitgehend unabhängig von der Temperatur erwies. Für die Populationsentwicklung von *Bacillus subtilis* stellten GUPTA & UTKHEDE (1986) ein Temperaturoptimum von 25 °C in sterilisiertem Boden fest. BOCHOW & GANTCHEVA

(1995) bezeichneten Temperaturen um 20 °C sowie einen Hitzeschock durch einstündiges Pasteurisieren von zuvor mit *Bacillus subtilis* behandeltem Substrat als förderlich für die Populationsentwicklung der introduzierten Bakterien. REDDY & RAHE (1989a) hoben hervor, dass das Überleben von *Bacillus subtilis* B-2 in der Rhizosphäre durch hohe Temperatur, hohe pH-Werte und hohe Feuchtigkeit günstig beeinflusst wird, wobei sie die Temperatur für die wichtigste Variable hielten. Sie ermittelten bei Temperaturen von 22 °C – 25 °C höhere Populationsdichten als bei 17 °C – 19 °C. Demgegenüber beschrieben TEDLA & STANGHELLINI (1992) die Generationsfolge der autochthonen Bakterienpopulationen im Rhizosphärenbereich bei ihren Versuchen als nahezu unabhängig von der Temperatur. Da die Entwicklung des pilzlichen Krankheitserregers *Pythium aphanidermatum* jedoch bei höheren Temperaturen schneller verlief, sahen sie in dieser Tatsache einen relativen Konkurrenzvorteil für die Bakterien bei niedrigeren Temperaturen.

Nicht nur die Besiedlung von Pflanzenmaterial (Samen, Wurzeln) und Boden wird vom Umweltfaktor Temperatur maßgeblich beeinflusst, sondern ebenso die Aktivität der Bakterien sowie ihre Produktion antifungaler und phytoeffektiver Substanzen.

GUPTA & UTKHEDE (1986) ermittelten in einem Temperaturbereich zwischen 21 °C und 28 °C und bei pH-Werten zwischen 5,0 und 8,0 die maximale Produktion antifungaler Substanzen durch *Bacillus subtilis*. KREBS et al. (1998) schrieben der Temperatur und den Nährstoffverhältnissen eine Schlüsselrolle für die antagonistische Aktivität von *Bacillus subtilis* zu, während andere ökologische Faktoren von untergeordneter Bedeutung zu sein schienen. KILIAN et al. (1998) hoben hervor, dass der Stamm *Bacillus subtilis* FZB24[®] trotz eines besseren Wachstums bei höheren Temperaturen auch bei niedrigeren Temperaturen stoffwechselaktiv ist. Dadurch war dieses Bakterienisolat in der Lage, bereits im Frühjahr einem Befall von Kartoffelpflanzen durch *Rhizoctonia solani* effektiv entgegenzuwirken, was sich in einer Auflaufverbesserung der Kartoffeln auch bei frühen Pflanzterminen äußerte. Dieses Erkenntnis ist von außerordentlicher Praxisrelevanz. FALKHOF et al. (1988) betonten, dass auch die Resistenzinduktion in Kulturpflanzen durch mikrobielle Stoffwechselprodukte stark von Umweltbedingungen, insbesondere der Temperatur, abhängt. Sie stellten fest, dass ständig wechselnde Temperaturverhältnisse und die Tagesgänge der Temperatur, wie sie normalerweise im Gewächshaus und im Freiland auftreten, von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Resistenzinduktion sind.

2.2.3 Physiko-chemische Bodeneigenschaften und mikrobielle Konkurrenz

Neben der Temperatur schreiben viele Autoren auch den Bodeneigenschaften eine große Bedeutung für die Populationsentwicklung eingebrachter PGPR zu. KILIAN et al. (1998) nennen Feuchte, pH-Wert, Bodenstruktur und Nährstoffversorgung als potenzielle Einflussfaktoren, denen biologische Pflanzenschutz- und Stärkungsmittel auf der Basis lebender Mikro- oder Makroorganismen unter Praxisbedingungen unterworfen sind. Durch die Bodentextur wird sowohl der passive Transport der Bakterien (BITTON et al. 1974) als auch deren Wurzelbesiedlungsverhalten beeinflusst (BAHME & SCHROTH 1987). LATOUR et al. (1996) stellten eine Abhängigkeit der Zusammensetzung von Pseudomonaden-Populationen an Pflanzenwurzeln von Pflanzenart und Bodentyp fest, wobei der letztgenannte Faktor der entscheidende war. Sie hoben hervor, dass Bodeneigenschaften nicht nur für die Überlebensfähigkeit der fluoreszierenden Pseudomonaden von ausschlaggebender Bedeutung sind, sondern auch für deren Aktivität. HÖPER et al. (1995) zeigten, dass eine Erhöhung des pH-Wertes des Bodens und eine Anreicherung des Substrates mit Ton zu einem signifikanten Anstieg der Populationsdichten autochthoner fluoreszierender Pseudomonaden führte. YUEN et al. (1985) fanden höhere Keimzahlen des introduzierten Bakterienstammes MFA1 (*Alcaligenes* sp.) in sandigem Lehm und Ton-Lehm-Böden mit nahezu neutralem pH-Wert als in Sand und lehmigem Sand mit niedrigem pH. TU (1994) untersuchte den Einfluss von Bodentemperatur und –feuchte auf das Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis* und stellte fest, dass von den 3 getesteten Temperaturstufen 10 °C, 20 °C und 30 °C die niedrigste am günstigsten für das Populationswachstum der Bakterien war. Zudem bestand eine signifikant umgekehrte Proportionalität der für die Populationsentwicklung optimalen Bodenfeuchte und Temperatur. BOCHOW (1994) schrieb den physiko-chemischen Eigenschaften der Substrate eine untergeordnete Bedeutung für die Populationsdynamik von *Bacillus subtilis* zu, hielt jedoch die Konkurrenz autochthoner Mikroorganismen für bedeutsam. Neben der Temperatur wurde von BOCHOW & GANTCHEVA (1995) das Vorhandensein von ausreichend Bodenfeuchte als entscheidender Faktor für das Populationswachstum von *Bacillus subtilis* beschrieben. Die Konkurrenz durch die aktive autochthone Mikroflora wurde von diesen Autoren als bedeutende limitierende Variable für die Entwicklung der eingebrachten Bakterien genannt. Für die Überlebensfähigkeit allochthoner Bakterien im Boden bezeichnete HIRTE (1977) die Menge und Qualität der organischen Substanz,

die Bodentemperatur, die Bodenart sowie die biologische Aktivität des Bodens als die stärksten Einflussfaktoren. Untersuchungen von LIU & SINCLAIR (1993), die in zwei verschiedenen autoklavierten Medien kaum Unterschiede im Besiedlungsverhalten von *Bacillus megaterium* beobachteten, legen die Vermutung nahe, dass die mikrobielle Konkurrenz die entscheidende Rolle für unterschiedliche Wurzelbesiedlung von introduzierten Mikroorganismen in verschiedenen Substrattypen spielt. So zeigten mehrere Autoren, dass die Besiedlungsdichte von Rhizosphäre und Substrat durch *Bacillus subtilis* am höchsten ist in künstlichen oder zuvor sterilisierten Substraten (GROSCH et al. 1996, BATINIC et al. 1998, KREBS et al. 1998). BAHME & SCHROTH (1987) fanden die höheren Keimzahlen von *Pseudomonas fluorescens* A1-B an Wurzelabschnitten von Kartoffelpflanzen in sandigem Lehm im Vergleich zu Ton-Lehm. SLININGER & JACKSON (1991) diskutieren den Einfluss verschiedener Nährstoffe auf das Wachstum von *Pseudomonas fluorescens*. SCHMIDT et al. (2000a) stellten fest, dass *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas corrugata* und *Bacillus subtilis* bei allen getesteten Boden-pH-Werten zwischen pH 5 und 8 in der Lage waren, die Rhizosphäre von Zuckerrübensämlingen zu besiedeln und dass der pH-Wert des Bodens keinen Einfluss auf die antagonistische Aktivität der Bakterien gegen *Pythium ultimum* hatte. Jedoch können Veränderungen im pH-Wert Verschiebungen in der Konkurrenzsituation zwischen autochthonen Mikroorganismen bewirken (DUGHRI & BOTTOMLEY 1984). Untersuchungen von DOWLING & BROUGHTON (1986) ergaben, dass der pH-Wert des Bodens die Knöllchenbildung und Überlebensfähigkeit von Rhizobien beeinflusste. Für die Wurzelbesiedlung durch Pseudomonaden wurde ein Matrixpotenzial des Bodens von -1 kPa bis -140 kPa als Optimalbereich angegeben (PARKE et al. 1984, HOWIE et al. 1987, LIDDELL & PARKE 1989). Bei einem hohen Matrixpotenzial des Bodens ist ein großer Teil des Porenvolumens mit Wasser gefüllt und der Sauerstoffvorrat ist gering (HOWIE et al. 1987), was für aerobe Bakterien wie *Bacillus subtilis* von Nachteil ist. Wegen des Sauerstoffbedarfs dieses Bakteriums ist dessen Etablierung und Aktivität in den oberen, gut durchlüfteten Bodenschichten am größten (BOCHOW 1989, FREIER et al. 1990a). SONI & KANWAR (1989) führten die Verminderung des Auftretens von Zuckerrohr-Welke durch Zugabe organischer Substanz (Reisspelzen und Sägemehl) hauptsächlich auf die damit erreichte Erhöhung der natürlich im Boden vorkommenden Population von *Bacillus subtilis* zurück. Sie wiesen darauf hin, dass durch die Zugabe organischer Substanz physikalische Bodeneigenschaften wie Porengröße, Belüftung und Temperatur beeinflusst werden, was wiederum zu einer Aktivitätserhöhung aerober

Bakterien wie *Bacillus subtilis* führt. Von einer Förderung natürlich vorkommender Antagonisten gegen *Sclerotinia rolfii* – unter ihnen *Bacillus subtilis* – durch Zugabe von organischer Substanz berichten PALAKSHAPPA et al. (1989). GUPTA & UTKHEDE (1987) zeigten, dass die antifungale Wirksamkeit von *Bacillus subtilis* von bestimmten Nährstoffkombinationen abhängt.

2.2.4 Eigenschaften der Interaktionspartner

Ob sich ein introduzierter Mikroorganismus überhaupt an der Pflanzenwurzel etablieren kann, hängt nach WINDELS et al. (1985) in entscheidendem Maß von Faktoren ab, die mit der Pflanze in Verbindung stehen. Die Autoren nennen in diesem Zusammenhang die Zugehörigkeit der Kultur zu Monokotylen bzw. Dikotylen, die Kultursorte sowie den Typ der Samenkeimung (epigäisch oder hypogäisch). Auch dem Verhältnis von Wurzelwachstum zu Sprosswachstum wird Bedeutung für die Wurzelbesiedlung durch eingebrachte Bakterien beigemessen.

Dass verschiedene Arten von Kulturpflanzen unterschiedlich auf Behandlung mit nützlichen Mikroorganismen reagieren, ist hinlänglich bekannt (NELSON et al. 1986, CHANWAY et al. 1988, VAN PEER & SCHIPPERS 1989, BERGER et al. 1996).

WELLER (1986) stellte außerdem fest, dass die Wurzelsysteme der von ihm untersuchten 11 Weizensorten unterschiedlich gut von einem antagonistisch wirksamen Stamm von *Pseudomonas fluorescens* besiedelt wurden. Er konnte auf Wurzelabschnitten 3-5 cm vom Samen entfernt Unterschiede in der Besiedlungsdichte des Bakteriums von bis zu zwei Zehnerpotenzen in Abhängigkeit von der jeweiligen Weizensorte finden. Ähnliche Beziehungen zwischen Kulturpflanzensorte und ihrer Besiedlungsfähigkeit durch nützliche Mikroorganismen fanden auch HEBBAR et al. (1992) bei ihren Versuchen mit *Pseudomonas cepacia* an Mais. Aus dieser Erkenntnis heraus scheint die Züchtung solcher Kulturpflanzensorten, die den Besatz mit krankheitsunterdrückenden Mikroorganismen fördern, eine weitere sinnvolle Maßnahme zu sein, um die Erfolgsaussichten der biologischen Bekämpfung boden- und samenbürtiger Pflanzenkrankheitserreger zu erhöhen (SMITH et al. 1997). CHANWAY & NELSON (1991) beobachteten eine sortenabhängige Wachstumsförderung von Sommerweizen durch *Bacillus* sp. Mit dem Einfluss der Sorte und der Sameneigenschaften auf das Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis* beschäftigten sich MAHAFFEE & BACKMAN (1991) sowie MAHAFFEE & BACKMAN (1993) bei ihren Versuchen an Baumwolle. Sie

machten Unterschiede im pH-Wert auf der Samenoberfläche wesentlich für die Variabilität der Besiedlung von Spermophäre und Keimwurzel durch *Bacillus subtilis* GB-03 verantwortlich. Die Autoren hielten es für möglich, dass Differenzen in der Wurzelbesiedlung durch das Nutzbakterium bei verschiedenen Baumwollsorten hauptsächlich auf sortenspezifische Unterschiede im pH-Wert der Samenoberfläche zurückzuführen sind. Die geringere Populationsdichte von *Bacillus subtilis* GB-03 auf der Samenoberfläche säurebehandelter, nicht neutralisierter Baumwollsaamen im Vergleich zu neutralisierten führten sie nicht auf eine Reduktion der Bakterienpopulation an sich, sondern auf die Hemmung der Sporenkeimung durch niedrige pH-Werte zurück (MAHAFFEE & BACKMAN 1993). LAM & TORKEWITZ (1991) merkten an, dass nicht alle von ihnen getesteten, an die Pflanzenwurzel gebundenen Pseudomonaden in der Lage waren, die gleichen Komponenten der Wurzelexsudate zu nutzen.

Von großem Einfluss sowohl auf das Besiedlungsverhalten eingebrachter Bakterien als auch deren antagonistische Wirksamkeit gegen mikrobielle Phytopathogene ist die applizierte Dosis (MCKNIGHT & ROSALL 1991). KREBS et al. (1993) stellten neben der eingebrachten Keimzahl von *Bacillus subtilis* die Häufigkeit der Applikation sowie den Anwendungszeitpunkt im Verhältnis zum Entwicklungsstadium der Pflanze als wichtige Einflussfaktoren für die Populationsdynamik der Bakterien heraus.

Aus dem Ergebnis umfangreicher Untersuchungen heraus empfehlen JUNGE et al. (1999) einen frühzeitigen Einsatz von *Bacillus subtilis*, um Auflauf und Frühentwicklung der Kulturpflanzen zu stimulieren. Auch MALIES (1995) erachtete es als bedeutungsvoll, dass das Bakterium bereits in einer sehr frühen Phase der Pflanzenentwicklung sein antagonistisches Potenzial zur Wirkung bringen kann. Durch die vergleichsweise schwache Konkurrenzkraft von *Bacillus subtilis* erscheint eine Saat- oder Pflanzgutbehandlung als optimal, damit Samen bzw. Pflanzenwurzel bereits durch den Antagonisten besetzt sind, bevor Mikroorganismen aus dem Substrat diese Nischen besiedeln. Anderenfalls ist von einer ineffektiven Wurzelbesiedlung durch *Bacillus subtilis* auszugehen, die mit dem Ausbleiben der erwünschten phytoeffektiven und phytosanitären Effekte einhergeht.

Bei Versuchen in erdeloser Tomatenkultur war bei Gießapplikation die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* direkt abhängig von der eingebrachten Sporendichte des Bakteriums (MALIES 1995). BULL et al. (1991) fanden eine direkte

Abhängigkeit der Populationsdichte von *Pseudomonas fluorescens* an Weizenwurzeln von der an die Samen applizierten Dosis. SCHMIDT et al. (2000b) beobachteten ein mit steigender introduzierter Keimzahl einhergehendes Anwachsen der Besiedlungsdichte und der antagonistischen Aktivität von *Pseudomonas fluorescens* an Zuckerrübensämlingen, während sich dieser Effekt bei *Pseudomonas corrugata* nicht zeigte. Auch bei *Bacillus subtilis* gibt es Hinweise auf Unterschiede im Besiedlungsverhalten einzelner Isolate (BOCHOW 1994, MALIES 1995). Dieses Erkenntnis deutet darauf hin, dass sich selbst nahe verwandte Mikroorganismen nach ihrem Einbringen in das System Pflanze – Boden populationsdynamisch sehr unterschiedlich verhalten können. Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass nur eine begrenzte Übertragbarkeit der Ergebnisse populations- und aktivitätsdynamischer Untersuchungen auf andere Mikroorganismenarten besteht.

XI et al. (1996) untersuchten den Einfluss zweier verschiedener Formulierungen eines fluoreszierenden Pseudomonaden-Stammes auf dessen Populationsdynamik an Erbsenwurzeln. Dabei ermittelten sie die höheren Populationsdichten bei Einsatz einer Torf-Formulierung im Vergleich zu einer Granulat-Formulierung. Im Zusammenhang mit der Rolle von Formulierung und Applikationstechnik diskutieren FREIER et al. (1990a) den Einfluss des Anteils versporter Zellen bei Applikation von *Bacillus subtilis*. Sie berichten, dass ein hoher Versporungsgrad in der Kulturlösung günstig für hohe Überlebensraten der eingebrachten Bakterien im Boden war, ein hoher Anteil an vegetativen Zellen jedoch zu einer besseren Unterdrückung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* führte. Das bedeutet, dass die Art der Formulierung von entscheidender Bedeutung für die Überlebensfähigkeit des introduzierten Mikroorganismus sowie dessen antagonistische Wirksamkeit ist. Außerdem favorisieren die Autoren für *Bacillus subtilis* T99 eine Gießbehandlung des Substrates als Applikationsform, da dieser Stamm ursprünglich aus der Bodenmikroflora einer Nelkenkultur isoliert wurde und somit kein typischer Rhizosphärenbesiedler ist. MALIES (1995) beobachtete in erdeloser Tomatenkultur bei Gießbehandlung eine gleichmäßigere und kontinuierlichere Besiedlung der einzelnen Wurzelbereiche durch *Bacillus subtilis* als bei Saatgutbehandlung. Als Mechanismen für die Verteilung der Bakterien in vertikaler Richtung nennt die Autorin neben der aktiven Eigenbewegung der Bakterien den passiven Transport durch Sickerwasser. Insbesondere letzteres kommt als Ursache für die gleichmäßigere Verteilung der Bakterienzellen bei Gießbehandlung in Betracht.

ALBRECHT (1995) erreichte durch kombinierte Saatgut- und Substratbehandlung sowie alleinige Substratbehandlung mit *Bacillus subtilis* eine höhere Populationsdichte in der Rhizosphäre von Radieschenpflanzen als durch alleinige Saatgutbehandlung.

2.3 Zusammenhang zwischen Populationsdichte und Wirksamkeit

Für die Wirkung von *Bacillus subtilis* ist keineswegs die Populationsdichte allein entscheidend. Diese Schlussfolgerung lässt sich bereits aus den Ergebnissen von REDDY & RAHE (1989a) ziehen, die phytoeffektive Wirkungen durch den *Bacillus subtilis*-Stamm B-2 beobachteten, obwohl dieser sich nicht in hoher Keimzahl an den Pflanzenwurzeln erhalten konnte.

Auch REDDY & RAHE (1989b), KOWALSKI (1992) und GANTCHEVA (1993) fanden keine direkte Beziehung zwischen der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* und dessen phytoeffektiver und antifungaler Leistung. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu Erfahrungen bei fluoreszierenden Pseudomonaden (BULL et al. 1991, RAAIJMAKERS et al. 1995). Aber auch bei *Pseudomonas*-Arten gibt es widersprüchliche Aussagen. So fanden LEEMAN et al. (1995) keine Korrelation zwischen zur Erntezeit ermittelter Populationsdichte von *Pseudomonas fluorescens* WCS374 und antifungaler Leistung gegen *Fusarium*-Welke an Radieschen. LIU et al. (1995) stellten heraus, dass die Ausprägung von durch *Pseudomonas putida* und *Serratia marcescens* induzierter systemischer Resistenz in Gurkenpflanzen nicht an große Populationen der introduzierten Bakterien gebunden war. Aus ihren Erkenntnissen zogen sie die Schlussfolgerung, dass ein PGPR-Stamm auch dann als „Biocontrol Agent“ effektiv sein kann, wenn er kein guter Wurzelbesiedler ist. Diese Tatsache spricht für *Bacillus subtilis*, denn auch wenn sich dieses Bakterium nicht in so großer Populationsdichte im Wurzelraum erhalten kann wie fluoreszierende Pseudomonaden, bedeutet das nicht, dass dessen antifungale Leistung schwächer sein muss.

Weitere Autoren verweisen darauf, dass es offenbar keinen direkten Zusammenhang zwischen Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Substrat bzw. an den Pflanzenwurzeln und seiner phytosanitären Aktivität gibt (REDDY & RAHE 1989b, KLOEPPER 1991, GANTCHEVA 1993, TUTZUN & KLOEPPER 1994, BOCHOW & GANTCHEVA 1995, HANDELSMANN & STABB 1996, GROSCH et al. 1996, ZIMMER et al. 1998). Von größerer Bedeutung als die Keimzahl von *Bacillus subtilis* ist offenbar die

Aktivität der Bakterienzellen (ZIMMER et al. 1999b). SCHMIDT et al. (2000a) ermittelten mit Hilfe messbarer Biolumineszenz in Hypokotyl-Proben von Zuckerrübensämlingen die Aktivität zuvor eingebrachter Isolate von *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus subtilis*. Sie stellten für *Pseudomonas fluorescens* eine hohe Aktivität in allen getesteten Böden fest, während bei *Bacillus subtilis* keine oder nur eine sehr geringe Biolumineszenz gemessen wurde. Dies ließ darauf schließen, dass die Population von *Bacillus subtilis* an Wurzel und Hypokotyl größtenteils aus versporteten Zellen bestand.

Das Verhältnis zwischen Populationsdichte von *Bacillus subtilis* zur phytoeffektiven Leistung und Pathogen unterdrückenden Wirkung ist auch Gegenstand dieser Arbeit.

3 Material und Methoden

3.1 Charakterisierung der Versuchsorganismen

3.1.1 Testpflanze Erbse (*Pisum sativum* L.)

Die Erbse gehört zur Familie der *Fabaceae* (Schmetterlingsblütengewächse) (BAUMANN et al. 1976). Wie alle Vertreter dieser Familie lebt sie in Symbiose mit stickstoffbindenden Bakterien (*Rhizobium*-Arten), die in der Lage sind, den Luftstickstoff zu verwerten (VOGEL et al. 1996).

Mittlere bis schwere Böden gelten für den Erbsenanbau als ertragsfähiger im Vergleich zu leichten. pH-Werte des Bodens im Bereich von 6,5-7,5 gelten als günstig.

Temperaturextreme sind für die Erbse von Nachteil. Für Trockensubstanz- und Ertragsbildung sowie für die Mineralstoffaufnahme sind Bodentemperaturen von ca. 15 °C optimal.

Die in den nachfolgend beschriebenen Versuchen verwendete Sorte 'Bördi' zählt zur Sortengruppe der Markerbsen und ist hinsichtlich der Reifezeit als früh bis mittel einzustufen (nach VOGEL et al. 1996).

3.1.2 Wurzelfäuleerreger *Phoma pinodella* (L.K.Jones) Morgan-Jones & Burch

Dieser Pilz, der lange Zeit als *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum. var. *pinodella* (L.K.Jones) Boerema bekannt war, wird der Unterabteilung *Deuteromycotina* (*Fungi imperfecti*), Klasse *Coelomycetes*, Ordnung *Sphaeropsidales* zugeordnet (HOFFMANN et al. 1994). Nach heutigem Verständnis handelt es sich bei *Phoma pinodella* um eine eigene Art (BOEREMA et al. 1993).

Auf Agar bildet der Pilz flache Kolonien mit hellgrauem bis schwarzem Luftmyzel. Die Bildung von Myzel und Pyknidien ist sehr variabel. Die Anordnung der Pyknidien ist zumeist regelmäßig. Die Konidien sind ellipsoid, 4-9 x 2-4 µm groß und teilweise zweizellig (DOMSCH et al. 1980).

Phoma pinodella wurde aus Ackerböden isoliert (DORENBOSCH 1970). DOMSCH et al. (1968) fanden den Pilz in gewaschenen Bodenpartikeln mit signifikant größerer Häufigkeit nach Anbau von Erbsen als nach Anbau von Weizen oder Raps. Ebenso wurde *Phoma pinodella* von Samen und Stängeln der Erbse (WINTER et al. 1974) und

Klee-Wurzeln (YLIMAEKI 1967) sowie aus der Rhizosphäre von Kartoffelpflanzen (DOMSCH et al. 1980) isoliert.

Phoma pinodella gilt als schwaches Pathogen an Erbsen, Rotklee und anderen Leguminosen (DOMSCH et al. 1980). An Erbsen verursacht der Pilz Fuß- und Stängelfäule (HOFFMANN et al. 1994). *Phoma pinodella* wird in der Literatur häufig zusammen mit *Ascochyta pisi* Lib. und *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Stone als Erreger der Brennfleckenkrankheit der Erbse genannt und tritt auch oft im Komplex mit den anderen beiden Arten auf (SPAAR et al. 1985, CRÜGER 1991). Während die anderen beiden Erreger vorwiegend an oberirdischen Pflanzenteilen Symptome verursachen, hat *Phoma pinodella* seine Hauptbedeutung als Fußkrankheitserreger und breitet sich vom Stängelgrund abwärts und aufwärts an der Pflanze aus (CRÜGER 1991), kann aber auch an den Hülsen auftreten und verursacht dort typische Strichelflecke (SPAAR et al. 1985). Der Pilz wird hauptsächlich mit dem Saatgut übertragen (CRÜGER 1991), kann aber auch über den Boden infizieren. Fußkrankheiten treten bevorzugt bei 6-8 °C auf, einzelne Erbsensorten sind unterschiedlich empfindlich gegenüber diesem Krankheitserreger (BEALE et al. 1991, CRÜGER 1991, KNAPPE & HOPPE 1994).

Die Palette der Bekämpfungsmöglichkeiten von *Phoma pinodella* ist gering. Im Wesentlichen beschränken sie sich auf phytohygienische Maßnahmen wie Anbau von Erbsen maximal alle 4 Jahre innerhalb einer Fruchtfolge und die Verwendung von gesundem Saatgut. Eine direkte Bekämpfung durch Saatgutbeizung mit fungiziden Wirkstoffen ist ebenfalls möglich, bringt aber allenfalls einen Teileffekt und gilt als unökonomisch (CRÜGER 1991).

Da *Phoma pinodella* vor allem als Fußkrankheitserreger Bedeutung hat und zuerst das Hypokotyl infiziert, bietet sich hier ein interessanter Ansatzpunkt für die biologische Unterdrückung durch mikrobielle Antagonisten (BEALE et al. 1991). Die Ergebnisse von ISSOUFOU (2000) zeigten eine gute Hemmung des Pilzes durch *Bacillus subtilis*-Isolate *in vitro*.

Für die Versuche wurden von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem insgesamt 5 von der Stängelbasis infizierter Erbsen- bzw. Ackerbohnenpflanzen isolierte *Phoma pinodella*-Stämme zur Verfügung gestellt. Auf Grundlage eigener Pathogenitätstests wurde das Isolat 62914 für die weitere Arbeit ausgewählt, da es sich als das aggressivste erwiesen hatte und deutlich sichtbare

Symptome in Form tief schwarzer, streifenförmiger Läsionen am Hypokotyl der Erbsenpflanzen verursachte.

Die Stammhaltung der *Phoma pinodella*-Isolate über einen längeren Zeitraum ohne Wirtspassage erfolgte auf Slight Nutrient Agar (SNA) nach NIRENBERG (1976) (Rezeptur s. *Anhang 1*). Das für die Versuche verwendete Isolat 62914 wurde zur Erhaltung der Virulenz einmalig vom Hypokotyl befallener Erbsenpflanzen ebenfalls auf SNA rückisoliert und für die folgenden Experimente verwendet.

3.1.3 Wurzelfäuleerreger *Rhizoctonia solani* Kühn

Wie *Phoma pinodella*, so gehört auch der Pilz *Rhizoctonia solani* zur Unterabteilung *Deuteromycotina* (*Fungi imperfecti*). Er wird dort der Klasse *Agonomycetes* zugeordnet (HOFFMANN et al. 1994).

Rhizoctonia solani wurde 1858 von Julius Kühn erstmals beschrieben und zählt zu den am längsten bekannten Pflanzenpathogenen. Das Teleomorph-Stadium wurde später als *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. beschrieben. Aus heutiger Sicht müsste der Pilz wegen der Auffindung des geschlechtlichen Stadiums taxonomisch korrekt in die Unterabteilung *Basidiomycotina* eingeordnet werden. Die Sammelart *Rhizoctonia solani* wird in Stämme mit mehrkernigen Myzelien und solche mit zweikernigen Myzelien eingeteilt. Erstgenannte Gruppe wird nach wie vor als *Rhizoctonia solani* bezeichnet, Vertreter der zweiten Gruppe werden als „*Rhizoctonia*-ähnliche Pilze“ eingestuft.

Das Myzel von *Rhizctonia solani* besteht aus septierten, dickwandigen, rechtwinklig verzweigten Hyphen. Als Überdauerungsorgane werden Sklerotien gebildet, aus denen bei ausreichender Feuchtigkeit zunächst subhyaline bis weiße, sich später braun verfärbende Laufhyphen entstehen. Die Ausbreitung der Hyphen an der Pflanze erfolgt sowohl inter- als auch intrazellulär, wobei kurze Seitenverzweigungen, die sich an den Laufhyphen bilden, sich appressorienartig an die Epidermiszellen der Pflanze anlegen und in diese eindringen (SCHMIEDEKNECHT 1990).

Isolate mit zwei Kernen je Zelle werden bisher in ca. 15 Anastomosegruppen (AG) unterteilt, die mit lateinischen Großbuchstaben versehen werden. Von mehrkernigen *Rhizoctonia solani*-Stämmen werden derzeit 11 Anastomosegruppen unterschieden, die durch arabische Zahlen gekennzeichnet werden (NIRENBERG 1996). Dabei können AG

1, 4 und 5 an Leguminosen Krankheitserscheinungen hervorrufen (NIRENBERG & DALCHOW 1988).

Der Pilz ist ein guter Bodensaprophyt und kann sich im Boden anreichern. Als Krankheitserreger ist *Rhizoctonia solani* beispielweise im Kartoffelanbau von Bedeutung (Wurzeltöter- und Pockenkrankheit) (HOFFMANN et al. 1994). Des Weiteren kann der Pilz bei Keimlingen vieler Pflanzenarten die Umfallkrankheit hervorrufen und ist daher besonders in der Jungpflanzenanzucht von Bedeutung (ROSENKRANZ 1996).

An der Gemüseerbse kann sich der Befall mit *Rhizoctonia solani* auf verschiedene Weise äußern. Einerseits kann bereits der gesamte Embryo des keimenden Samens zerstört werden, was sich in einem schlechten Auflaufergebnis ausdrückt. Zum anderen können primäre Sprosse geschädigt werden, die später durch Seitentriebe ersetzt werden. Die Entstehung von Wunden auf dem unterirdischen Stängel durch die Pilzinfektion führt meist zum klassischen Umfall-Symptom. *Rhizoctonia solani* kann auch die Keimblätter der Erbsenpflanzen zeitig vernichten, wodurch der jungen Pflanze die gespeicherten Nährstoffe entzogen werden (BRAUN 1930, SEIDEL et al. 1990).

Das Auftreten der *Rhizoctonia*-Krankheit an Kulturpflanzen ist in starkem Maße von Lage, Wetter und Boden abhängig. Günstige Bedingungen für den Pilz stellen beispielsweise schwere, tonig-lehmige Böden und ein kühles Frühjahr dar (MEIER 1985).

Zur biologischen Bekämpfung von *Rhizoctonia solani* existieren bereits Erfahrungen mit einer Reihe mikrobieller Antagonisten, darunter *Bacillus subtilis* (SCHMIEDEKNECHT 1990, GANTCHEVA 1993, ALBRECHT 1994, SCHMIEDEKNECHT et al. 1996, KILIAN et al. 1998, SCHMIEDEKNECHT et al. 1998).

Für die hier dargestellten Untersuchungen wurden von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem insgesamt folgende 5 *Rhizoctonia solani*-Isolate zur Verfügung gestellt:

- 65806, isoliert von Erbsenwurzeln,
- 62999, isoliert von Lupinenwurzeln,
- 66984, isoliert von Lupinenwurzeln,
- 65116, isoliert von Kartoffeln sowie

- 63007, isoliert von Kartoffeln.

Die Stammhaltung der einzelnen Isolate erfolgte auf zuvor sterilisierten Getreideähren.

In vorausgegangenen Pathogenitätstests erwies sich das Lupinen-Isolat 66984 mit einem Anteil befallener Erbsenpflanzen von 92,9 % und einem Krankheitsindex $K_i = 58,7$ % als der aggressivste *Rhizoctonia solani*-Stamm an Erbsenpflanzen der Sorte 'Bördi' (GETMANOVA 1997) und wurde daher für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.1.4 Nutzbakterium *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn

Das Nutzbakterium *Bacillus subtilis* ist taxonomisch in die Ordnung *Eubacteriales*, Klasse *Schizomycetes*, Familie *Bacillaceae* einzuordnen. Die Bakterienzellen sind stäbchenförmig mit einer Länge von 2,0–3,0 μm und einer Breite von 0,7–0,9 μm . Sie sind peritrich begeißelt und gram-positiv (COOK & BAKER 1983, SINCLAIR 1989, SCHLEGEL 1992).

Bacillus subtilis ist ein aerobes, mesophiles Bakterium, dass weit verbreitet im Staub und Erdboden vorkommt. Die Zellen sind in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 55 °C aktiv (SINCLAIR 1989), wobei das Optimum für das Wachstum in sterilem Boden bei etwa 25 °C liegt (GUPTA & UTKHEDE 1986). Es werden pH-Werte zwischen 4,5 und 8,5 vertragen, das Optimum liegt in einem Bereich von 6,0 bis 7,5 (THIMANN 1964, WANDKE 1992).

Bei Vorliegen ungünstiger Entwicklungsbedingungen ist *Bacillus subtilis* in der Lage, Endosporen zu bilden, die äußerst widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen sind (SINCLAIR 1989). Die Sporen sind in der Lage, in wässriger Bodensuspension 10minütige Wärmebehandlungen von 80 °C bzw. eine 30minütige Bodendämpfung von 60 °C zu überstehen (BROADBENT et al. 1977, COOK & BAKER 1983).

Sämtliche in den vorliegenden Versuchen getesteten *Bacillus subtilis*-Isolate¹ wurden von der FZB Biotechnik GmbH isoliert und zur Verfügung gestellt. Untersuchungen erfolgten mit dem Referenz-Stamm FZB24[®], der in Deutschland als Pflanzenstärkungsmittel gelistet ist, sowie mit den Stämmen FZB27 und FZB47. Die beiden letzteren Isolate besitzen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum

¹ In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe „Stamm“ und „Isolat“ synonym verwendet.

Streptomycin und sind dadurch nach Reisolation von Pflanzenwurzeln oder aus dem Substrat eindeutig zu determinieren. Der Ausgangsstamm von FZB27 ist FZB13, der von FZB47 ist der Referenzstamm FZB24[®]. FZB47 ist in der Lage, bis zu einer Streptomycin-Konzentration von 200 µg / ml zu wachsen. Die Streptomycin-Resistenz der genannten Stämme ist chromosomal gebunden und wird somit unverändert weitervererbt (JUNGE et al. 1999).

3.2 Charakterisierung der verwendeten Substrate

3.2.1 Quarzsand

Für die in Quarzsand durchgeführten Versuchsreihen wurde Quarzsand Dorsilit mit einer Korngröße von 0,6 bis 1,2 mm verwendet. Das Substrat war also weitgehend gleichförmig und enthielt kaum pflanzenverfügbare Nährstoffe. Die folgenden kennzeichnenden Parameter wurden durch eigene Messung ermittelt:

- pH-Wert: 6,78
- Aktivität der Salze in Bodenlösung: 0,08 g / l Boden

Die angegebenen Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus 10 Messungen. Die pH-Messung wurde mit dem Gerät pH-AGRAR 2000 und die Bestimmung der Aktivität der Bodensalze mit AM-PET 2000 direkt in kulturfeuchtem Substrat vorgenommen.

Nach Angaben des Messgeräteherstellers bedeutet der ermittelte Wert für die Aktivität der Salze in Bodenlösung von 0,08 g / l Boden eine geringe Aktivität. Bei diesem Wert ist die pflanzliche Aufnahme der Nährstoff-Elemente N, Cl und S mäßig, die von K, Na, Ca, Mg, B und Mo gering und die von P, Fe, Mn, Zn, Cu und Al unzureichend.

3.2.2 Feldboden und Einheitserde Typ Null

Verwendet wurde ein sandiger Feldboden von der Margaretenhöhe in der Nähe von Berlin-Hohenschönhausen. Nach Untersuchungen der LUFA wurden die in Tab.1 dargestellten Nährstoffgehalte ermittelt.

Tab.1: Nährstoffgehalte des in den Versuchen verwendeten Feldbodens

Nährstoff-Element	Gehalt [g / kg]
Stickstoff	0,64
Phosphor	0,96
Kalium	1,05
Magnesium	0,66
Kalzium	0,92
Eisen (gesamt)	6,83

Der Boden wurde durch Sieben auf eine maximale Korngröße von ca. 2 mm gebracht und mit Einheitserde Typ Null vermischt. Bei Einheitserde Typ Null handelt es sich um ein aufgekalktes, aber nicht weiter aufgedüngtes Torfprodukt. Es wurde in seiner recht groben Textur belassen. Das Mischungsverhältnis Feldboden : Einheitserde Typ Null betrug 2 : 1. Im folgenden Text steht der Begriff Feldboden jeweils für die Mischung des gesiebten, sandigen Feldbodens mit Einheitserde Typ Null. Von diesem Gemisch wurden durch eigene Messungen ermittelt:

- pH-Wert: 5,68
- Aktivität der Salze in Bodenlösung: 0,31 g / l Boden

Die Messungen erfolgten wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

Der ermittelte Wert für die Aktivität der Salze in Bodenlösung von 0,31 g / l Boden bedeutet eine mittlere Aktivität. Bei diesem Wert ist die pflanzliche Aufnahme der Nährstoff-Elemente N, Cl und S gut, die von K, Na, Ca, Mg, B und Mo ausreichend und die von P, Fe, Mn, Zn, Cu und Al mäßig.

3.2.3 Aussaaterde

Bei dem verwendeten Kultursubstrat Floragard Aussaaterde handelt es sich um ein Torfprodukt nach DIN 11540-F50. Das Substrat besteht aus stark zersetztem Hochmoortorf (H₂-H₄ und H₇-H₉) mit allen für das Pflanzenwachstum erforderlichen Nährstoffen. Wichtige Eigenschaften des Kultursubstrats werden in Tab.2 genannt.

Tab.2: Wichtige Eigenschaften von Floragard Aussaaterde (Herstellerangaben)

Stickstoff-Gehalt (Reinnährstoff)	50-300 mg / l
Phosphor-Gehalt (P ₂ O ₅)	80-300 mg / l
Kalium-Gehalt (K ₂ O ₅)	80-400 mg / l
Salz-Gehalt	1,5 g / l
Gehalt an organischer Substanz	60 %
pH-Wert (CaCl ₂)	5 bis 6

Die Herstellerangabe des pH-Wertes wurde durch eigene Messungen bestätigt.

Diese ergaben folgende Ergebnisse:

- pH-Wert: 5,60
- Aktivität der Salze in Bodenlösung: 0,74 g / l Boden

Die Messungen erfolgten wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

Der ermittelte Wert für die Aktivität der Salze in Bodenlösung von 0,74 g / l Boden bedeutet eine hohe Aktivität. Bei diesem Wert ist die pflanzliche Aufnahme der Nährstoff-Elemente N, Cl, S, K, Na, Ca, Mg, B, Mo, P, Fe, Mn, Zn, Cu und Al gut.

3.3 Versuchsdesign

3.3.1 Versuchsserie 1

Ziel der ersten Versuchsserie war die Gewinnung von Erkenntnissen über das Verhalten von *Bacillus subtilis* in einem nährstoffarmen, biologisch wenig aktiven Substrat.

Dazu wurden fünf Modellversuche unter kontrollierten Bedingungen im Phytotron durchgeführt. Als Substrat fand Quarzsand Verwendung. Die Samen der Testpflanzen (Erbsen) wurden einen Tag vor Versuchsbeginn 10 min in 3 %iger NaOCl-Lösung äußerlich desinfiziert und anschließend 24 h in sterilem Leitungswasser vorgequollen. Als Versuchsgefäße dienten Plastikbecher, die mit 250 ml Substrat gefüllt wurden.

In den zu beschreibenden fünf Versuchen wurden alle steuerbaren ökologischen Faktoren mit Ausnahme der Temperatur konstant gehalten. Die relative Luftfeuchte

betrug einheitlich 65 %, die Belichtungsdauer wurde mit täglich 11 h festgelegt, wobei die Beleuchtungsintensität am Versuchsboden bei ca. 6,5 klx lag. Die Versuchsdauer betrug jeweils 30 Tage. Die Versuche wurden bei den Temperaturstufen 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C durchgeführt, wobei die Temperatur jeweils über den gesamten Versuchszeitraum konstant gehalten wurde.

Getestet wurden zwei verschiedene *Bacillus subtilis*-Stämme: FZB24® und FZB27. Diese lagen in Form eines Granulats mit einer Ausgangskonzentration von $1 \cdot 10^{11}$ cfu / g vor, als Trägerstoff diente Kaliumnitrat. Aus diesem Granulat wurden Sporensuspensionen der Konzentrationen 10^7 , 10^8 und 10^9 cfu / ml hergestellt. Zur Saatgutbehandlung wurden die vorgequollenen Erbsensamen 10 min in die Sporensuspension der entsprechenden Konzentration getaucht und anschließend nach einer kurzen Antrocknungsphase ausgesät. Die Saattiefe betrug 2 cm. Bei einigen Varianten wurde eine zusätzliche Substratbehandlung durchgeführt, wobei unmittelbar nach der Aussaat 30 ml Sporensuspension der entsprechenden Konzentration je Gefäß gegossen wurden. Jeder der fünf Versuche bestand aus den in Tab.3 dargestellten 14 Varianten.

In Variante 14 wurde mit einer Kaliumnitrat-Konzentration gearbeitet, die jener in den Varianten 3 und 9 entsprach. Sie diente der Ergründung des Einflusses des Trägerstoffes auf das Wachstum der Erbsenpflanzen. Von jeder Variante wurden fünf Gefäße aufgestellt, wobei jedes Gefäß einer Wiederholung entsprach. Je Versuchsgefäß wurden drei Erbsensamen eingebracht.

Für die täglichen Wassergaben wurde steriles Leitungswasser verwendet, um einen Mikroorganismeneintrag über das Wasser in das biologisch wenig aktive Medium mit geringen Puffereigenschaften weitgehend zu vermeiden. Um eine gleichmäßige Wasserversorgung zu gewährleisten, wurde jedes der Versuchsgefäße auf eine Gesamtmasse von 450 g aufgegossen.

Tab.3: Varianten von Versuchsserie 1

Varianten-Nr.	<i>Bacillus subtilis</i> Stamm	Konzentration der Sporensuspension [cfu / ml]	Saatgut-behandlung	Substrat-behandlung
1	unbehandelte Kontrolle			
2	FZB24 [®]	1*10 ⁹	X	
3	FZB24 [®]	1*10 ⁹	X	X
4	FZB24 [®]	1*10 ⁸	X	
5	FZB24 [®]	1*10 ⁸	X	X
6	FZB24 [®]	1*10 ⁷	X	
7	FZB24 [®]	1*10 ⁷	X	X
8	FZB27	1*10 ⁹	X	
9	FZB27	1*10 ⁹	X	X
10	FZB27	1*10 ⁸	X	
11	FZB27	1*10 ⁸	X	X
12	FZB27	1*10 ⁷	X	
13	FZB27	1*10 ⁷	X	X
14	Kaliumnitrat		X	X

Hinsichtlich des Besiedlungsverhaltens von *Bacillus subtilis* wurden folgende Aspekte untersucht:

- äußerliches Anhaften von *Bacillus subtilis*-Keimen am behandelten Saatgut,
- Rhizosphärenbesiedlung durch *Bacillus subtilis* nach 30 Tagen Versuchsdauer, dabei getrennte Betrachtung von
Wurzelspitze (äußere 3 cm von Haupt- und Seitenwurzeln),
Wurzelmittelstück (Hauptwurzelabschnitt im Abstand 1,5 bis 4 cm vom Samenansatz, inklusive Seitenwurzelansätze bis zu 1 cm Länge),
Wurzeloberteil (Hauptwurzelabschnitt vom Samenansatz bis 1,5 cm Abstand vom Samenansatz, inklusive Seitenwurzelansätze bis zu 1 cm Länge),
- Substratbesiedlung durch *Bacillus subtilis* nach 30 Tagen Versuchsdauer.

Über die Methodik zur Reisolation der introduzierten Bakterienstämme gibt Abschnitt 3.4.3 Auskunft.

Des Weiteren wurden folgende Wachstumsparameter der Erbsenpflanzen bestimmt:

- Frischmasse von Spross und Wurzel,
- Sprosslänge,
- absolute Wurzellänge (vgl. Abschnitt 3.4.1).

3.3.2 Versuchsserie 2

Zur weiteren Untersuchung der Populationsdynamik von *Bacillus subtilis* und dessen antagonistischer Wirksamkeit gegen ein pilzliches Phytopathogen wurden drei Modellversuche unter kontrollierten Bedingungen im Phytotron durchgeführt.

Die angewandte Methodik entsprach weitgehend jener aus Versuchsserie 1. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten waren auch die Versuchsbedingungen dieselben wie bei der vorangegangenen Versuchsreihe. Es wurde diesmal jedoch nur mit drei Temperaturstufen gearbeitet: 15 °C, 20 °C und 25 °C.

Der *Bacillus subtilis*-Stamm FZB24[®] wurde durch den Streptomycin-resistenten Stamm FZB47 ersetzt, der ansonsten in wesentlichen Eigenschaften mit FZB24[®] übereinstimmt (vgl. Abschnitt 3.1.4). Wie in Versuchsserie 1 wurde daneben auch noch FZB27 verwendet.

Für die Introduktion des Nutzbakteriums wurde diesmal einheitlich Sporensuspension in einer Konzentration von 10^8 cfu / ml verwendet. Anstelle unterschiedlicher Konzentrationen der Sporensuspension wurden bei dieser Versuchsreihe drei verschiedene Trägersubstanzen getestet: Sand, Kaliumnitrat und Maisstärke. Die verwendeten beiden *Bacillus subtilis*-Stämme lagen jeweils in allen drei Formulierungen vor.

Drei Tage nach der Aussaat erfolgte die Inokulation mit dem phytopathogenen Pilz *Phoma pinodella*, Isolat 62914. Der Pilz war zuvor auf Petrischalen mit Erbsenagar (Rezeptur s. *Anhang 2*) überimpft und 4-6 Wochen im Brutschrank bei 25 °C gehalten worden. Für die Inokulation wurde eine Sporensuspension mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ cfu / ml durch Abspülen der Platten mit sterilem Leitungswasser hergestellt, von

welcher jeweils 20 ml / Gefäß appliziert wurden. Die Inokulumdichte der Konidien suspension wurde mittels Thomakammer ermittelt.

Von jeder Variante wurden fünf Gefäße aufgestellt, wobei jedes Gefäß einer Wiederholung entsprach. Je Versuchsgefäß wurden 6 Erbsensamen eingebracht.

Hinsichtlich des Besiedlungsverhaltens von *Bacillus subtilis* wurden folgende Aspekte untersucht:

- äußerliches Anhaften von *Bacillus subtilis*-Keimen am behandelten Saatgut,
- Rhizosphärenbesiedlung durch *Bacillus subtilis* nach 30 Tagen Versuchsdauer an der Wurzelspitze,
- Substratbesiedlung durch *Bacillus subtilis* nach 30 Tagen Versuchsdauer.

Des Weiteren wurden folgende Wachstumsparameter der Erbsenpflanzen bestimmt:

- Frischmasse von Spross und Wurzeln,
- Trockenmasse von Spross und Wurzeln,
- Sprosslänge.

Außerdem wurde der Krankheitsbefall bonitiert und der Krankheitsindex berechnet (s. Abschnitt 3.4.2).

3.3.3 Versuchsserie 3

Aus der Überlegung heraus, dass in den ersten beiden Versuchsserien bereits grundsätzliche Erkenntnisse über das populationsdynamische Verhalten des zu untersuchenden Nutzbakteriums gewonnen werden konnten, beschränkten sich die Untersuchungen zur Populationsdynamik sowie zur phytoeffektiven und gesundheitsfördernden Leistung von *Bacillus subtilis* in Feldboden auf eine, drei Versuche umfassende Reihe. Die in Quarzsand durchgeführten Versuchsserien 1 und 2 wurden hier zusammengefasst.

Die angewandte Methodik entsprach weitgehend jener aus Versuchsserie 1. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten waren auch hier die Versuchsbedingungen dieselben wie bei den vorangegangenen beiden Versuchsreihen. Es wurde mit den drei Temperaturstufen 15 °C, 20 °C und 25 °C gearbeitet.

Anstelle von Quarzsand wurde hier ein sandiger Feldboden in Gemisch mit Einheitserde Typ Null verwendet. In jedes Versuchsgefäß wurden 350 g dieses Substrates gefüllt.

Die verwendeten Stämme von *Bacillus subtilis* waren wie in Versuchsserie 2 FZB47 und FZB27. Die Notwendigkeit der Arbeit mit markierten Stämmen ergab sich hier in besonderem Maße, da in Feldboden mit einem natürlichen Vorkommen von *Bacillus subtilis* gerechnet werden musste. Für die Behandlung der Versuche mit dem Nutzbakterium wurde ausschließlich die Formulierung auf Sand verwendet, um eine Beeinflussung des Pflanzenwachstums durch den Trägerstoff weitgehend auszuschließen. Die Applikation der Bakterien erfolgte in Form von Sporensuspension der Konzentrationen 10^8 und 10^9 cfu / ml. Behandelt wurde das Erbsensaatgut bzw. Saatgut und Substrat in der gleichen Weise wie bei Versuchsserie 1. Bei dem Stamm FZB27 erfolgte ausschließlich die kombinierte Anwendung (Saatgut- und Substratbehandlung).

Einer jeden Variante wurde eine entsprechende, mit dem phytopathogenen Pilz *Phoma pinodella* inokulierte Variante gegenübergestellt. Anzucht und Inokulation des Pilzes wurden wie bei Versuchsserie 2 durchgeführt. Die Konzentration der ausgebrachten Sporensuspension von *Phoma pinodella* wurde gegenüber den Versuchen in Quarzsand jedoch von $1 \cdot 10^5$ cfu / ml auf $5 \cdot 10^5$ cfu / ml erhöht, um eine ausreichende Symptomausprägung zu erreichen.

Da es sich bei dem hier verwendeten Feldboden um ein Substrat mit wesentlich besseren Puffereigenschaften im Vergleich zu Quarzsand handelt, erfolgten die täglichen Wassergaben mit unsterilem Leitungswasser.

Hinsichtlich des Besiedlungsverhaltens von *Bacillus subtilis* wurden folgende Aspekte untersucht:

- äußerliches Anhaften von *Bacillus subtilis*-Keimen am behandelten Saatgut,
- Rhizosphärenbesiedlung durch *Bacillus subtilis* nach 30 Tagen Versuchsdauer an der Wurzelspitze,
- Substratbesiedlung durch *Bacillus subtilis* nach 30 Tagen Versuchsdauer.

Des Weiteren wurden folgende Wachstumsparameter der Erbsenpflanzen bestimmt:

- Frischmasse von Spross und Wurzeln,

- Trockenmasse von Spross und Wurzeln,
- Sprosslänge.

Außerdem wurde der Krankheitsbefall bonitiert und der Krankheitsindex berechnet.

3.3.4 Langzeitversuch

Hauptziel des Langzeitversuches war die Untersuchung der Überlebensfähigkeit von *Bacillus subtilis* im Substrat nach 60 Tagen, also der doppelten Versuchsdauer wie in den anderen Versuchen. Weiterhin galt es zu ergründen, inwiefern sich Pflanzenwachstum-fördernde Effekte durch *Bacillus subtilis*-Applikation nach 60 Tagen Versuchszeit zeigen.

Um die Aussagekraft der Ergebnisse abzusichern, wurde die Anzahl der Wiederholungen auf 14 erhöht, die Variantenzahl dagegen auf 5 verringert. Der Langzeitversuch bestand insgesamt aus den in Tab.4 aufgeführten Varianten.

Tab.4: Varianten des Langzeitversuchs

Varianten-Nr.	<i>Bacillus subtilis</i> -Stamm	Konzentration der Sporensuspension [cfu / ml]	Saatgut-behandlung	Substrat-behandlung
1	unbehandelte Kontrolle			
2	FZB47	$1 \cdot 10^8$	X	
3	FZB47	$1 \cdot 10^8$		X
4	FZB47	$1 \cdot 10^8$	X	X
5	FZB27	$1 \cdot 10^8$	X	X

Als Substrat diente in diesem Versuch Feldboden + Einheitserde Typ Null (vgl. 3.2.2). Je Gefäß wurden 5 Erbsensamen eingebracht. Der Versuch wurde im Phytotron bei einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt.

Beide *Bacillus subtilis*-Isolate wurden in einer Formulierung auf Sand als Trägerstoff verwendet, um zusätzliche Effekte des Trägerstoffs auf das Besiedlungsverhalten des Nutzbakteriums sowie auf das Pflanzenwachstum möglichst auszuschließen. Für die

Substratbehandlungen wurden jeweils 30 ml der *Bacillus subtilis*-Sporensuspension entsprechender Konzentration je Gefäß eingebracht.

Wassergaben erfolgten täglich mit Leitungswasser.

Alle an dieser Stelle nicht beschriebenen Versuchsbedingungen sowie die Vorbehandlung der Samen und die Applikation der Bakterien-Sporensuspension entsprachen der in Abschnitt 3.3.1 angegebenen Methodik.

Nach Ablauf von 60 Tagen nach der Aussaat wurden folgende Daten erfasst:

- Frischmasse von Spross und Wurzel der Testpflanzen,
- Sprosslänge der Testpflanzen,
- Keimzahl von *Bacillus subtilis* im Substrat.

3.3.5 Einzelversuche zur Populations- und Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis*

Mit den an dieser Stelle zu beschreibenden Experimenten wurden folgende Ziele verfolgt:

- Untersuchung der Populationsentwicklung von *Bacillus subtilis* in Substrat, Rhizosphäre und Rhizoplane innerhalb von 30 Tagen bei 6 Probenahmeterminen,
- Gewinnung von Erkenntnissen zur Aktivitätsdynamik durch Ermittlung des Versporungsgrades der Bakterien,
- vergleichende Untersuchungen zur Populations- und Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis* in Quarzsand und in Feldboden.

Um diese Aufgabenstellungen zu bearbeiten, waren zwei Versuche erforderlich, die methodisch in ähnlicher Weise durchgeführt wurden wie die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen, die Variantenaufteilung war die gleiche wie beim Langzeitversuch (Abschnitt 3.3.4). Die Applikationen erfolgten wie bei Versuchsserie 1. Die beiden Versuche unterschieden sich lediglich dadurch, dass im ersten Quarzsand als Substrat verwendet wurde, im zweiten Feldboden + Einheitserde Typ Null. Auf die Inokulation mit *Phoma pinodella* wurde an dieser Stelle verzichtet. Die Versuchstemperatur betrug konstant 20 °C.

Von jeder Variante wurden 14 Gefäße (Wiederholungen) aufgestellt, die mit jeweils 6 Erbsensamen versehen wurden. Im Abstand von 5 Tagen, also zu 6 Terminen innerhalb der Versuchszeit von 30 Tagen, wurden von jeder Variante 2 bis 3 Gefäße zu Probenahmezwecken entfernt. Es erfolgte sofort zum Entnahmetermin die Reisolation von Substratproben und Wurzelspitzen (Methodik s. Abschnitt 3.4.3), wobei bei letzteren unterschieden wurde zwischen Rhizosphäre (Wurzeln und anhaftendes Substrat) und Rhizoplane (gewaschene Wurzeln). Am ersten Probenahmetermin wurde wegen der noch gering ausgebildeten Wurzelmasse der Keimpflanzen auf die Keimzahlbestimmung in der Rhizoplane verzichtet.

Neben der Bestimmung der Populationsdichte wurde der Versporungsgrad als Maß für die Aktivität des Nutzbakteriums in Rhizoplane, Rhizosphäre sowie im Substrat ermittelt (Methodik s. Abschnitt 3.4.3).

Zur Beurteilung des Anteils von *Bacillus subtilis* an der gesamten Mikroorganismenpopulation im Rhizosphärenbereich und im Substrat wurde außerdem die Gesamtkeimzahl (Bakterien und Pilze) bestimmt.

3.3.6 Komplexversuche

In Ergänzung der bisher dargestellten Experimente wurden 3 Komplexversuche zum Vergleich der Wirksamkeit von *Bacillus subtilis* gegen zwei pilzliche Pflanzenpathogene unter Hinzuziehung eines Neem-Präparates als Bio-Fungizid durchgeführt. Folgende konkrete Zielstellungen standen dabei im Mittelpunkt:

- Ergründung des Einflusses einer kombinierten Anwendung von *Bacillus subtilis* mit einem Neem-Präparat (Beschreibung s.u.) auf Pflanzenwachstum, Krankheitsbefall sowie Populationsdichte und Aktivität des Nutzbakteriums,
- Untersuchung des Einflusses von Pathogen, *Bacillus subtilis* und Neem-Präparat auf die Wachstumsleistung der Testpflanzen,
- Vergleich der Wirksamkeit von *Bacillus subtilis* gegen *Phoma pinodella* mit der gegen *Rhizoctonia solani*,
- Ermittlung eines etwaigen Pathogeneinflusses auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis*.

Als Substrat wurde bei einem der drei Versuche Feldboden + Einheitserde Typ Null (vgl. 3.2.2), bei zwei weiteren Floragard Aussaaterde (vgl. 3.2.3) verwendet. Einer der Versuche in Aussaaterde wurde unter kontrollierten Bedingungen im Phytotron bei einer konstanten Temperatur von 20 °C, einer relativen Luftfeuchte von 65 %, einer Belichtungsdauer von täglich 11 h und einer Beleuchtungsintensität am Versuchsboden von ca. 6,5 klx durchgeführt. Die Realisierung der anderen beiden Versuche erfolgte unter Gewächshausbedingungen bei einer mittleren Temperatur von ca. 20 °C (± 10 °C) und einer mittleren relativen Luftfeuchte von ca. 70 % (± 20 %).

Vorbehandlung und Aussaat der Erbsen erfolgten wie in Versuchsserie 1, Kultivierung und Inokulation mit *Phoma pinodella* wie in Versuchsserie 2. Um eine deutliche Symptomausprägung zu erhalten, wurde die Sporenkonzentration auf $3 \cdot 10^6$ cfu / ml erhöht. Die Inokulation wurde drei Tage nach Aussaat durchgeführt. Dabei wurden jeweils 20 ml Sporensuspension je Gefäß eingebracht.

Vorkultivierung und Inokulation des *Rhizoctonia solani*-Isolats erfolgte leicht verändert nach der Methode von GANTCHEVA (1993). Dazu wurden zunächst Myzelstücke aus der Getreideähren-Kultur auf Petrischalen mit Kartoffeldextrose-Agar (PDA) überimpft. Von einer vollbewachsenen PDA-Platte wurde dann ein ca. 1 cm² großes Impfstück entnommen. Dieses wurde in mit 100 ml Kartoffeldextrose-Flüssigmedium (PDB) gefüllte 300 ml-Erlmeyerkolben überimpft und anschließend bei 25 °C drei Wochen im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar vor der Inokulation wurde die gewachsene Myzeldecke entfernt. Ca. 20 g der Myzeldecke wurden anschließend in 600 ml sterilem Leitungswasser mit Hilfe eines Mixers homogenisiert. Von dieser Myzelsuspension wurden jeweils 20 ml je Aussaatgefäß eingebracht. Die Inokulation erfolgte wie bei *Phoma pinodella* drei Tage nach Aussaat der Erbsen.

Als *Bacillus subtilis*-Stamm wurde für diese Versuche ausschließlich FZB47 verwendet. Die Applikationen erfolgten wie unter 3.3.1 beschrieben mit einer Konzentration von jeweils 10^8 cfu / ml für Saatgut- und Substratbehandlung.

Als Bio-Fungizid kam das Neem-Präparat Rakshak Gold (Murkumbi Bio-Agro Pvt. Ltd. Belgam, Indien) mit einer Ausgangskonzentration von 10000 ppm Azadirachtin zum Einsatz. Bei diesem Mittel handelt es sich um eine Neemöl-Formulierung. Das Präparat hatte sich in vorangegangenen Versuchen in bestimmten Konzentrationen als gut verträglich für Erbsenpflanzen herausgestellt. Für die Beimischung zu der *Bacillus*

subtilis-Sporensuspension zur Saatgut- bzw. Substratbehandlung wurde eine Konzentration von 10 ppm Rakshak Gold gewählt. Ein Beimischen von 10 ppm dieses Neem-Präparats zu PDA hatte bei zuvor durchgeführten *in vitro*-Tests zu einer Hemmung des Wachstums von *Phoma pinodella* und zu einer Förderung des Koloniewachstums von *Bacillus subtilis* geführt (ZIMMER et al. 1999a). Die Behandlung von Samen bzw. Substrat erfolgte mit der gleichen Konzentration.

Die Applikation des Neem-Präparates und von *Bacillus subtilis* wurde jeweils als Saatgut- und Substratbehandlung am Tag der Aussaat durchgeführt.

Über die einzelnen Varianten der Komplexversuche gibt Tab.5 Auskunft.

Tab.5: Varianten der Komplexversuche

Varianten-Nr.	<i>Bacillus subtilis</i>	Rakshak Gold	<i>Phoma pinodella</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
1	unbehandelte Kontrolle			
2			X	
3				X
4		X		
5	X			
6	X		X	
7	X			X
8		X	X	
9		X		X
10	X	X	X	
11	X	X		X

Es wurden jeweils 6 Gefäße (= 6 Wiederholungen) aufgestellt, die mit je 6 Erbsensamen bestückt wurden. Wassergaben erfolgten täglich mit gewöhnlichem Leitungswasser.

Nach 30 Tagen Versuchsdauer wurden folgende Daten erfasst:

- Frischmasse von Spross und Wurzel der Testpflanzen,
- Sprosslänge der Testpflanzen,
- Krankheitsbefall der Testpflanzen, Ermittlung des Krankheitsindex,
- Keimzahl und Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* an den Wurzelspitzen (äußere 3 cm),
- Keimzahl und Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* im Substrat.

3.4 Versuchsauswertung

3.4.1 Erfassung von Wachstumsparametern der Testpflanzen

Zur Bestimmung der Sprosslänge der Testpflanzen wurde der Bereich vom Samen bis zum Ansatz des obersten Laubblattes gemessen.

Die Ermittlung der absoluten Wurzellänge erfolgte nach NEWMAN (1966), indem das gesamte Wurzelsystem einer Pflanze in eine mit wenig Wasser gefüllte Schale mit einem 1 x 1 cm Raster gelegt und die Anzahl der Schnittpunkte mit den horizontalen und vertikalen Gitternetzlinien ausgezählt wurden. Die Wurzellänge wurde dann nach folgender Formel errechnet:

$$R = \frac{N * A * \Pi}{2 * H}$$

R = absolute Wurzellänge

N = Anzahl der Schnittpunkte

A = Fläche des verwendeten Rasters

H = totale Länge aller Gitternetzlinien

In einigen Versuchen wurden außer der Frischmasse auch die Trockenmassen von Spross und Wurzel ermittelt. Dazu wurden die Pflanzenteile 48 h bei einer Temperatur von 65 °C getrocknet.

3.4.2 Ermittlung des Krankheitsbefalls der Testpflanzen

Die Ermittlung des Befalls von Erbsenpflanzen durch *Rhizoctonia solani* erfolgte nach einem fünfstufigen Bonitursystem in Anlehnung an GOOSS (1976), JANKE & HUBERT (1987) sowie GANTCHEVA (1993):

- Boniturstufe 0: Spross und Wurzel normal entwickelt, keine Läsion an den Wurzeln, am Hypokotyl oder Epikotyl (gesund);
- Boniturstufe 1: Pflanzenwachstum normal, vereinzelte braune Läsionen an Wurzeln oder am Hypokotyl und Epikotyl (schwach befallen);
- Boniturstufe 2: Verminderung der Wurzel- und Sprosslänge, zahlreiche Läsionen an den Wurzeln sowie am Hypokotyl und Epikotyl (mittelstark befallen);
- Boniturstufe 3: Pflanzenwachstum stark reduziert, gesamte Wurzel hell- bis dunkelbraun gefärbt, Hypokotyl- und Epikotylteile mit zahlreichen braunen Läsionen (stark befallen);
- Boniturstufe 4: Gesamte Wurzel unter Braunfärbung zersetzt; Pflanze vertrocknet und umgefallen oder im Absterben begriffen (abgetötet bzw. sehr stark befallen).

In Ableitung dieses Boniturschemas erfolgte in ähnlicher Weise die Bonitur des Krankheitsbefalls durch *Phoma pinodella* an Erbsenpflanzen:

- Boniturstufe 0: keine Läsion am Hypokotyl oder Epikotyl (gesund);
- Boniturstufe 1: Pflanzenwachstum normal, vereinzelte schwarze, streifige Läsionen am Hypokotyl und Epikotyl (schwach befallen);
- Boniturstufe 2: Pflanzenwachstum normal oder leicht vermindert, zahlreiche streifige, zusammenfließende Läsionen am Hypokotyl und Epikotyl (mittelstark befallen);
- Boniturstufe 3: Pflanzenwachstum stark reduziert, Hypokotyl- und Epikotylteile mit flächigen, Stängel umfassenden schwarzen Läsionen (stark befallen);
- Boniturstufe 4: Pflanze welk oder abgestorben, Hypokotyl, Epikotyl und Wurzel schwarz verfärbt (abgetötet bzw. sehr stark befallen).

Als Ausdruck des Krankheitsbefalls wurde der Krankheitsindex nach folgender Formel berechnet:

$$Ki[\%] = \frac{\sum (B * n) * 100}{N * 4}$$

Ki = Krankheitsindex

B = Boniturstufe

n = Anzahl der Pflanzen je Boniturstufe

N = Gesamtzahl der Pflanzen je Wiederholung bzw. je Variante

4 = höchste Boniturstufe

3.4.3 Reisolation der introduzierten *Bacillus subtilis*-Isolate

Nährmedium:

Zur Bestimmung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre und im Substrat wurde Standard-I-Nähragar (Merck) mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 30 mg / l Nystatin
- 100 mg / l Kaliumdichromat
- 100 mg / l Cycloheximid
- 200 mg / l PCNB (Pentachloronitrobenzene)

(Rezeptur nach GROSCH 1996)

Die Zusätze dienen der Unterdrückung des Wachstums von Pilzen und gram-negativen Bakterien. Da das Erbsensaatgut vor der Behandlung mit *Bacillus subtilis* mit Natriumhypochloritlösung äußerlich desinfiziert worden war, fand für die Reisolation des behandelten Erbsensaatgutes Standard-I-Nähragar ohne Zusätze Verwendung.

Vorgehensweise:

Zur Ermittlung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche des behandelten Erbsensaatgutes wurden jeweils 10 Erbsen (ca. 2 g) nach Antrocknung in 98 ml steriler, 0,3 %iger NaCl-Lösung 30 min bei 220 rpm geschüttelt. Danach erfolgte die Herstellung von Verdünnungsstufen. Auf die Nährbodenplatten mit Standard-I-Nähragar wurden jeweils 0,1 ml pro Petrischale pipettiert und mit einem Drigalski-

Spatel auf dem Nährboden verteilt. Die Agarplatten wurden anschließend 2 Tage bei 25 °C im Brutschrank inkubiert und danach die *Bacillus subtilis*-Kolonien ausgezählt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe erfolgte die Berechnung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* je Erbsensamen nach folgender Beziehung:

$$KZ = \frac{10 * C * V}{N}$$

KZ = Keimzahl *Bacillus subtilis* je Erbsensamen

C = Anzahl der *Bacillus subtilis*-Kolonien je Petrischale

V = Verdünnungsstufe

N = Anzahl für die Reisolation verwendeter Erbsensamen

10 = Multiplikationsfaktor

Für die Bestimmung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Rhizosphärenbereich wurde von jeweils einer Erbsenpflanze je Gefäß (Wiederholung) das Substrat vorsichtig von der Wurzel abgeschüttelt und anschließend je Variante eine Mischprobe hergestellt, wobei die im Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Wurzelabschnitte (Wurzeloberteil, Wurzelmittelstück, Wurzelspitze) getrennt reisoliert wurden. Von den Wurzelproben mit dem nach Abschütteln noch anhaftenden Substrat wurde 1 g in 99 ml steriler, 0,3 %iger NaCl-Lösung 30 min bei 220 rpm geschüttelt. Die Herstellung der Verdünnungsreihen und das Ausplattieren auf Standard-I-Nähragar mit oben angegebenen Zusätzen erfolgte wie bei der Ermittlung der Keimzahl am behandelten Erbsensaatgut. Als Bezugsgröße für die Berechnung der Populationsdichte diente die Trockenmasse der Wurzeln einschließlich des noch anhaftenden Substrates. In Abwandlung der Formel für die Berechnung der Anzahl am Erbsensaatgut anhaftender *Bacillus subtilis*-Keime ergibt sich für die Reisolation von Wurzelmaterial folgende Beziehung:

$$KZ = \frac{10 * C * V}{TM}$$

KZ = Keimzahl *Bacillus subtilis* je g Trockenmasse

C = Anzahl der *Bacillus subtilis*-Kolonien je Petrischale

V = Verdünnungsstufe

TM = Gesamttrockenmasse des reisolierten Wurzelmaterials mit anhaftendem Substrat

10 = Multiplikationsfaktor

Zur Ermittlung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* im Quarzsand wurden 10 g von dem Substrat in 90 ml sterilem Leitungswasser 30 min bei 220 rpm geschüttelt. Die Reisolierung erfolgte auch hier mit der bereits beschriebenen Verdünnungsplattenmethode, die Keimzahlbestimmung nach der gleichen Beziehung wie für die Reisolation von Wurzelmaterial.

Beginnend mit Versuchsserie 2 wurde anstelle von Standard-I-Nähragar wegen der kompakteren, für die Keimzahlermittlung günstigeren Kolonieform von *Bacillus subtilis* (KREBS 1998) Waksman-Agar (Rezeptur s. *Anhang 3*) verwendet. Zum Erreichen einer effektiveren Arbeitsweise wurden für die Reisolation von Wurzelteilen (Rhizosphäre bzw. Rhizoplane) und Substrat die Agarplatten ab Versuchsserie 2 in 3 möglichst gleichgroße Sektoren aufgeteilt. Pro Sektor wurden jeweils 0,02 ml von den entsprechenden Verdünnungsstufen auf den Nährboden pipettiert und mit dem Drigalski-Spatel verteilt, sodass je 3 Wiederholungen auf einer Petrischale untergebracht werden konnten. Der Multiplikationsfaktor bei der Berechnung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* betrug dann entsprechend 50 anstatt 10 wie in den oben gezeigten Formeln.

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Rhizosphäre und Substrat bei den unter 3.3.5 beschriebenen Versuchen wurde R₂A-Agar nach REASONER & GELDREICH (1985) in kommerziell erhältlicher Form (DIFCO) als standardisiertes, nährstoffreiches, nichtselektives Medium verwendet. Damit kann insbesondere eine große Anzahl von Bakterienarten erfasst werden (DECHEMA 1992, KREBS 1998). Von der aus Wurzel- bzw. Substratproben gewonnenen Suspension wurden von verschiedenen Verdünnungsstufen je 0,1 ml je Petrischale ausplattiert. Die so beimpften Petrischalen mit R₂A-Medium wurden 10 Tage bei 20 °C bebrütet und danach ausgezählt.

Zur Ermittlung des Versporungsgrades bei den unter 3.3.5 und 3.3.6 beschriebenen Versuchen wurden dieselben Reagenzgläser der Verdünnungsreihe, aus denen Sporensuspension zur Feststellung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* auf das Nährmedium ausplattiert wurde, anschließend in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 80 °C 20 min erhitzt, um vegetative Zellen des introduzierten Bakteriums abzutöten. Danach wurde erneut ausplattiert. Aus der Differenz der ermittelten Keimzahlen vor und nach der Wärmebehandlung erfolgte die Berechnung des Versporungsgrades [%].

3.4.4 Statistische Auswertung

Bei Vorliegen von Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden die ermittelten Boniturdaten mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse verrechnet. Der Mittelwertvergleich erfolgte mit Hilfe des TUKEY-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$.

Da bei der Berechnung des Krankheitsindex auf Boniturnoten als nicht metrisch skalierte Variable zurückgegriffen wurde, fand hier für die Mittelwertvergleiche der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) Verwendung.

Bei der Keimzahlermittlung wurden die errechneten Werte zur Erreichung einer Varianzhomogenität in den dekadischen Logarithmus ($\log \text{ cfu } \textit{Bacillus subtilis} / \text{g}$ Wurzel- bzw. Substrattrockenmasse) überführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS für Windows (Version 8.0).

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsserie 1

4.1.1 Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis*

Die für jeden der fünf Versuche ermittelte Menge der am behandelten Erbsensaatgut anhaftenden Keime von *Bacillus subtilis* zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom angewandten Titer (Abb.1). Bei gleichem angewandten Titer und gleichem *Bacillus subtilis*-Isolat wurden bei keinem der Versuche signifikante Unterschiede in der Anzahl am Saatgut anhaftender Bakterienkeime deutlich, sodass die Daten aus den einzelnen Versuchen in Abb.1 zusammengefasst werden konnten.

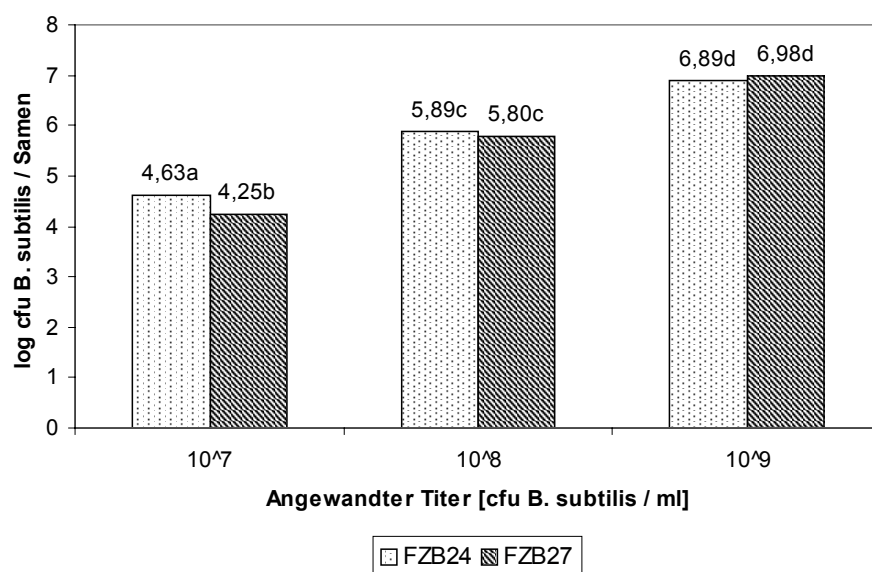


Abb.1: Mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche von behandeltem Erbsensaatgut bei Versuchsserie 1

Die mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* je Samen lag nach Applikation etwas mehr als zwei Zehnerpotenzen unter dem angewandten Titer. Unterschiede zwischen beiden verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämmen wurden kaum sichtbar, lediglich bei Behandlung mit 10^7 cfu / ml war die Keimzahl bei FZB27 signifikant niedriger im Vergleich zu FZB24®. Eine höhere Konzentration der Sporensuspension des

Nutzbakteriums, in die die Erbsensamen vor Aussaat getaucht wurden, führte entsprechend zu einer statistisch nachweisbar höheren Anzahl anhaftender *Bacillus subtilis*-Keime am Erbsensaatgut. Auf der Oberfläche von Samen aus der unbehandelten Kontrolle wurde in keinem Fall *Bacillus subtilis* gefunden.

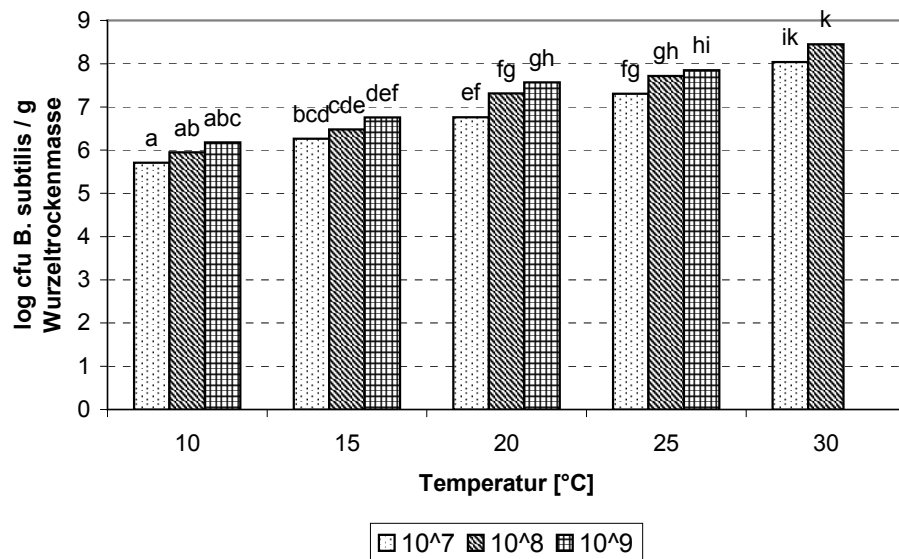


Abb.2: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB24® an Erbsenwurzeln in Quarzsand nach 30 Tagen bei alleiniger Saatgutbehandlung

Die Rhizosphärenbesiedlung durch *Bacillus subtilis* erwies sich als stark temperaturabhängig. Diese Abhängigkeit ist in den Abbildungen 2 und 3 am Beispiel von *Bacillus subtilis* FZB24® dargestellt. Je höher die Temperatur während der Versuchszeit war, desto höhere Keimzahlen wurden an den Wurzeln ermittelt. Besonders deutlich zeigte sich dieser Temperatureinfluss bei alleiniger Saatgutbehandlung, bei der fast jede Temperaturerhöhung um 5 °C zu einer signifikant höheren Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB24® führte (Abb.2). Demgegenüber war zumindest beim höchsten angewandten Titer bei kombinierter Anwendung von FZB24® kaum noch ein Temperatureinfluss erkennbar – lediglich zwischen den Temperaturstufen 10 °C und 25 °C konnte hier noch ein signifikanter Unterschied gefunden werden (Abb.3).

Die Besiedlungsdichte der applizierten Bakterien war ebenfalls stark von der Art und Weise der Applikation abhängig. Allgemein wurde bei einer kombinierten Anwendung

von *Bacillus subtilis* (Saatgut- und Substratbehandlung) eine höhere Populationsdichte festgestellt als bei einer ausschließlichen Saatgutapplikation entsprechender Konzentration. Das galt für beide verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämme und alle Temperaturstufen gleichermaßen. Beim *Bacillus subtilis*-Stamm FZB24[®] wurden bei kombinierter Anwendung in einer Konzentration von 10^9 cfu / ml bereits bei einer Temperatur von 10 °C während des Versuches Keimzahlen von nahezu 10^9 cfu / g Wurzeltrockenmasse an den Wurzelspitzen ermittelt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Unterschiede zwischen beiden Applikationsformen hinsichtlich der Keimzahl im Rhizosphärenbereich umso größer waren, je höher der applizierte Titer war (größte Unterschiede zwischen den Applikationsformen bei angewandtem Titer von 10^9 cfu / ml). Bei gleicher Art der Behandlung stieg die zum Versuchsende ermittelte Besiedlungsdichte entsprechend der Höhe des angewandten Titers. Die Differenzen hinsichtlich der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* zwischen den einzelnen Varianten waren bei den niedrigeren Temperaturen deutlicher erkennbar als bei den höheren und mit Ausnahme des Versuches bei 30 °C auch signifikant. Bei einer Versuchstemperatur von 30 °C waren bei FZB24[®] und einem angewandten Titer von 10^9 cfu / ml weder bei alleiniger Saatgutbehandlung noch bei kombinierter Anwendung zum Versuchsende lebende Pflanzen vorhanden, sodass dieser Wert in den Abbildungen 2 und 3 fehlt.

Prinzipiell ähnelte das Verhalten des zweiten verwendeten *Bacillus subtilis*-Stammes FZB27 dem des oben beschriebenen FZB24[®], jedoch wies FZB24[®] bei gleicher Applikationsform und gleicher Temperatur meist etwas höhere Besiedlungsdichten auf als FZB27. Bei alleiniger Saatgutbehandlung mit 10^8 cfu / ml war dieser Unterschied bei 30 °C statistisch abzusichern (Abb.4).

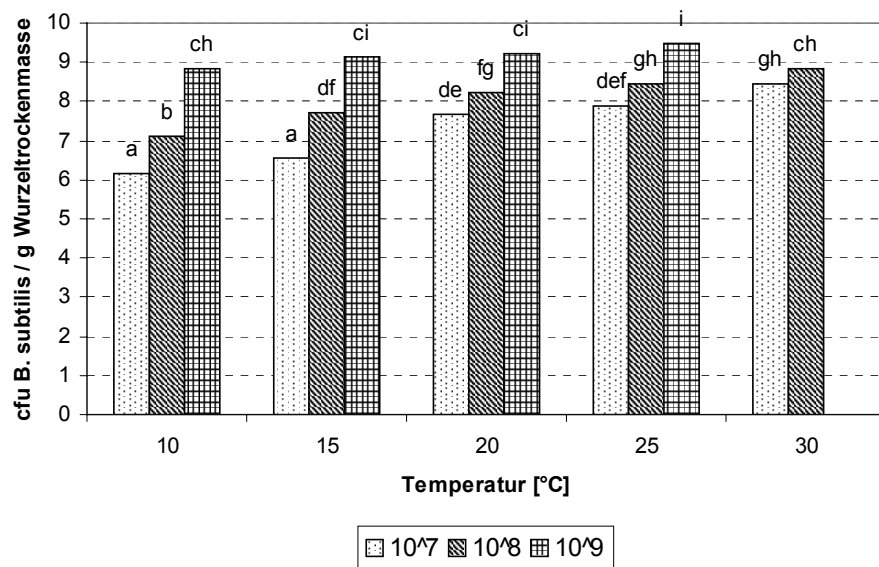


Abb.3: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB24® an Erbsenwurzeln in Quarzsand nach 30 Tagen bei kombinierter Anwendung (Saatgut- und Substratbehandlung)

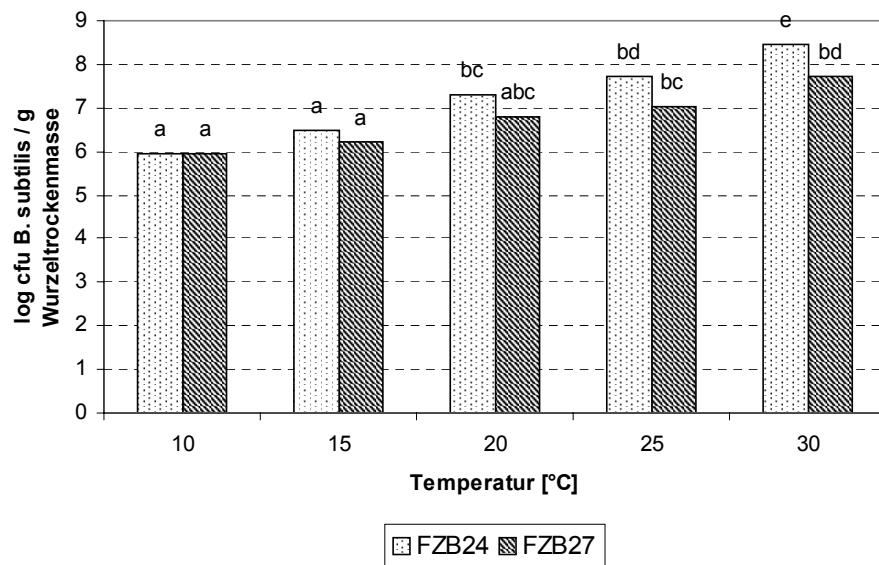


Abb.4: Vergleich der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB24® und FZB27 an Erbsenwurzeln in Quarzsand nach 30 Tagen bei alleiniger Saatgutbehandlung mit 1*10⁸ cfu / ml

Beim Vergleich der einzelnen Wurzelabschnitte wurden die höchsten Keimzahlen an den Wurzelspitzen ermittelt, die niedrigsten am Wurzeloberteil. Besonders deutlich wurden diese Unterschiede bei kombinierter Saatgut- und Substratbehandlung sowie bei hohen Temperaturen im Versuchszeitraum (Abb.5 und 6). Bei alleiniger Saatgutbehandlung waren bei Temperaturen von 10 °C und 20 °C im mittleren Wurzelabschnitt die niedrigsten Keimzahlen von *Bacillus subtilis* FZB24[®] ermittelt worden. Obgleich sich die Unterschiede in der Populationsdichte des Nutzbakteriums an einzelnen Wurzelabschnitten innerhalb ein und derselben Temperaturstufe zumeist unter einer Zehnerpotenz bewegten, konnte die höhere Besiedlungsdichte an der Wurzelspitze gegenüber Wurzelmittelstück und Wurzeloberteil bei kombinierter Anwendung bei 30 °C und bei alleiniger Saatgutbehandlung bei allen Temperaturstufen statistisch abgesichert werden.

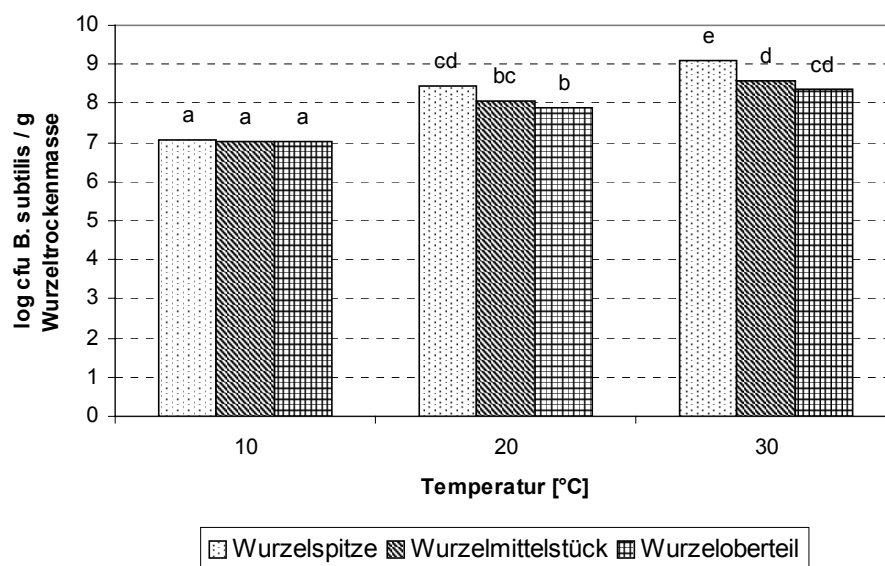


Abb.5: Besiedlung einzelner Wurzelabschnitte durch *Bacillus subtilis* FZB24[®] bei Saatgut- und Substratbehandlung mit $1 \cdot 10^8$ cfu / ml bei 3 Temperaturstufen

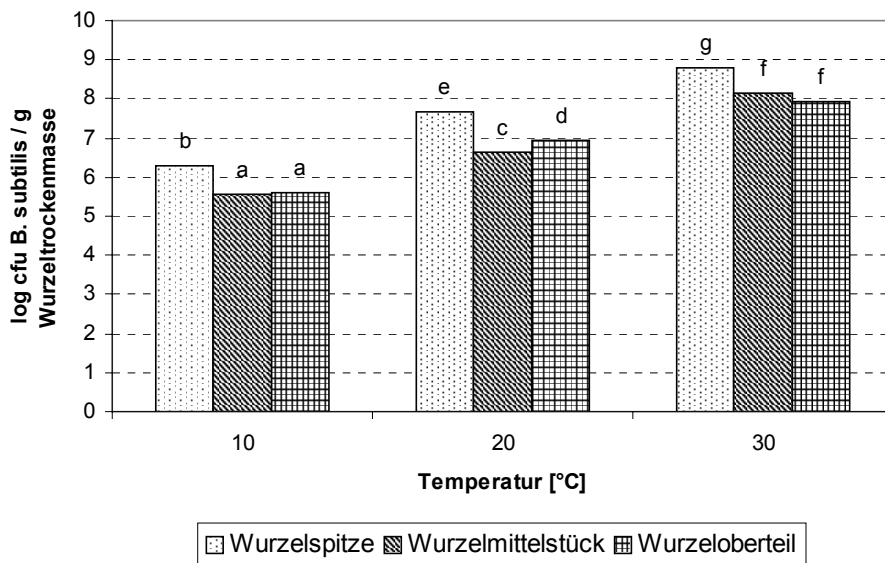


Abb.6: Besiedlung einzelner Wurzelabschnitte durch *Bacillus subtilis* FZB24[®] bei alleiniger Saatgutbehandlung mit $1 \cdot 10^8$ cfu / ml bei 3 Temperaturstufen

In der unbehandelten Kontrolle konnte *Bacillus subtilis* meist nicht nachgewiesen werden; bei der höchsten Temperaturstufe (30 °C) war eine Kontamination der Kontrollvariante nicht zu vermeiden. Bei 30 °C war ein rasches Austrocknen der obersten Schicht des Substrates zu beobachten. Durch die Luftbewegung in der Klimakammer ist eine Übertragung von *Bacillus subtilis*-Sporen von Pflanzgefäßen behandelter Varianten auf die unbehandelte Kontrolle denkbar.

Die in Tab.6 dargestellten Keimzahlen von *Bacillus subtilis* im Substrat (Quarzsand) lagen zwischen 2,68 und 8,37 log cfu / g Substrat, wobei in Abhängigkeit von Behandlungsmodus und Temperatur ähnliche Unterschiede deutlich wurden wie im Rhizosphärenbereich. Auch hier war ein Anwachsen der Populationsdichte mit steigender Temperatur festzustellen. Dieser Effekt trat insbesondere bei den Varianten mit alleiniger Saatgutbehandlung zutage. Bei den Varianten mit kombinierter Saatgut- und Substratapplikation betrug der Unterschied in der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* zwischen der niedrigsten (10 °C) und der höchsten (30 °C) Temperatur bei einer Behandlungskonzentration von 10^8 bzw. 10^9 cfu / ml weniger als eine Zehnerpotenz. Demzufolge waren auch bei der Untersuchung des Besiedlungsverhaltens von *Bacillus subtilis* im Quarzsand die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten bei

der niedrigsten Temperatur (10 °C) festzustellen, während diese bei steigender Temperatur sich immer mehr verwischten und teilweise nicht statistisch abzusichern waren. So betrug die niedrigste Keimzahl im Substrat bei 10 °C 2,68 log cfu / g, während der höchste Wert bei 7,99 log cfu / g lag. Bei 30 °C betrug der maximale Unterschied zwischen den Varianten (Kontrolle ausgenommen) kaum mehr als zwei Zehnerpotenzen. Bei der niedrigsten eingebrachten Keimzahl von *Bacillus subtilis* (10^7 S) führte jede Temperaturerhöhung um 5 °C zu einer signifikanten Erhöhung der Besiedlungsdichte im Substrat, ausgenommen die Temperaturerhöhung von 20 °C auf 25 °C. Demgegenüber konnte bei der größten introduzierten Keimzahl des Nutzbakteriums (10^9 S+B) selbst bei 30 °C die Erhöhung der Populationsdichte gegenüber 10 °C nicht statistisch abgesichert werden.

Tab.6: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* (FZB24[®] und FZB27) in Quarzsand nach 30 Tagen [log cfu / g Trockenmasse]

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
10^7 S	2,68 a	3,56 b	4,34 cd	5,01 de	5,98 fg
10^7 S+B	5,58 ef	5,99 fg	6,26 fghi	6,59 ghik	6,88 iklm
10^8 S	3,56 b	4,61 d	5,65 ef	6,18 fgh	6,87 iklm
10^8 S+B	6,67 hiki	6,79 hiki	7,11 klm	7,28 lm	7,39 mn
10^9 S	3,88 bc	4,78 d	6,17 fgh	6,58 ghik	7,01 klm
10^9 S+B	7,99 no	8,04 o	8,21 o	8,34 o	8,37 o

Die Differenzen im populationsdynamischen Verhalten von *Bacillus subtilis* FZB24[®] und FZB27 im Quarzsand waren gering, daher wurden in Tab.6 die Werte beider Stämme zusammengefasst dargestellt. In den meisten Fällen wurden aber auch hier die etwas höheren Keimzahlen bei den Behandlungen mit FZB24[®] ermittelt. Bei einer Temperatur von 30 °C war auch in der unbehandelten Kontrolle sowie in der ausschließlich mit Kaliumnitrat behandelten Variante *Bacillus subtilis* im Substrat nachweisbar. Ursache dafür könnte eine Kontamination wie bereits an anderer Stelle erklärt sein, wobei durch das rasche Wachstum der *Bacillus subtilis*-Population bei der hohen Temperatur entsprechende Keimzahlen zu ermitteln waren. Diese betrugen 5,09

log cfu / g (unbehandelte Kontrolle) bzw. 5,15 log cfu / g (Kaliumnitrat) und lagen damit signifikant unter denen aller behandelten Varianten bei dieser Temperaturstufe.

4.1.2 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das Pflanzenwachstum

Ein Effekt von *Bacillus subtilis* auf das Auflaufverhalten der Erbsenpflanzen wurde in keinem der Versuche festgestellt. Der Auflauf war in allen Varianten recht gleichmäßig. Lediglich bei Applikation einer Sporensuspension der Konzentration 10^9 cfu / ml (kombinierte Anwendung) kam es zu einer Verzögerung des Auflaufs der Testpflanzen, die in der Regel bis zum Versuchsende nicht ausgeglichen werden konnte und sich in einer negativen Beeinflussung insbesondere des Wurzelwachstums niederschlug, wie aus den folgenden Tabellen hervorgeht.

Der Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das Wachstum der Erbsenpflanzen ist in den Tabellen 7-10 für die einzelnen Temperaturstufen dargestellt. In dem bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführten Versuch war das Auflaufergebnis derart schlecht, dass wegen der geringen Pflanzenzahl auf eine Auswertung der Wachstumsparameter verzichtet wurde.

Bei einer Versuchstemperatur von 10 °C kam es durch alle Behandlungen zu einer Erhöhung von Sprossfrischmasse und Sprosslänge gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Tab.7). Die Behandlungen mit FZB24® 10^9 cfu / ml (kombinierte Anwendung) und Kaliumnitrat führten zu Einschränkungen im Wurzelwachstum der Testpflanzen, alle anderen Varianten wiesen eine höhere Frisch- und Trockenmasse der Wurzel sowie eine größere Wurzellänge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Trotz einer teilweise beträchtlich erscheinenden Wachstumsverbesserung der Erbsenpflanzen durch die Behandlungen mit *Bacillus subtilis* konnten diese Unterschiede nur in wenigen Fällen statistisch gesichert werden. Die stärksten Effekte auf das Pflanzenwachstum, insbesondere im Hinblick auf das Sprosswachstum wurden bei kombinierter Anwendung einer Sporensuspension der Konzentration 10^8 cfu / ml erreicht.

Tab.7: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer bei 10 °C

FM = Frischmasse

TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	Wurzel- länge [cm]	TM Wurzel [g]
Kontrolle	0,26	1,08	3,43	79	0,0347
FZB24 10 ⁷ S	0,45	1,52	4,21	155	0,0407
FZB24 10 ⁷ S+B	0,44	1,45	4,21	139	0,0539
FZB24 10 ⁸ S	0,44	1,40	4,37	125	0,0446
FZB24 10 ⁸ S+B	0,51	1,57	4,49	132	0,0679
FZB24 10 ⁹ S	0,48	1,39	4,63	123	0,0559
FZB24 10 ⁹ S+B	0,30	0,88	4,33	37	0,0231
FZB27 10 ⁷ S	0,36	1,13	3,84	124	0,0430
FZB27 10 ⁷ S+B	0,44	1,45	4,22	152	0,0527
FZB27 10 ⁸ S	0,43	1,43	4,01	131	0,0484
FZB27 10 ⁸ S+B	0,54	1,57	4,41	174	0,0592
FZB27 10 ⁹ S	0,38	1,40	3,97	162	0,0465
FZB27 10 ⁹ S+B	0,42	1,22	3,85	80	0,0351
Kaliumnitrat	0,54	1,23	4,41	63	0,0342
GD (HSD) 0,05	0,23	n.s.	1,06	132	n.s.

Tab.8: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer bei 15 °C

FM = Frischmasse

TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	Wurzel- länge [cm]	TM Wurzel [g]
Kontrolle	0,63	0,82	10,52	328	0,0331
FZB24 10 ⁷ S	0,62	0,92	9,72	293	0,0279
FZB24 10 ⁷ S+B	0,67	0,76	10,50	256	0,0259
FZB24 10 ⁸ S	0,61	0,67	9,96	253	0,0257
FZB24 10 ⁸ S+B	0,83	0,74	10,51	219	0,0229
FZB24 10 ⁹ S	0,70	0,88	10,59	251	0,0297
FZB24 10 ⁹ S+B	0,63	0,45	9,62	110	0,0117
FZB27 10 ⁷ S	0,60	0,65	8,38	223	0,0243
FZB27 10 ⁷ S+B	0,68	0,79	10,32	348	0,0308
FZB27 10 ⁸ S	0,59	0,53	9,42	185	0,0174
FZB27 10 ⁸ S+B	0,96	1,08	10,63	315	0,0281
FZB27 10 ⁹ S	0,85	1,15	9,39	383	0,0405
FZB27 10 ⁹ S+B	0,97	0,79	8,94	225	0,0236
Kaliumnitrat	0,63	0,60	8,30	234	0,0291
GD (HSD) 0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.9: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer bei 20 °C

FM = Frischmasse

TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	Wurzel- länge [cm]	TM Wurzel [g]
Kontrolle	1,11	1,56	8,69	299	0,0404
FZB24 10 ⁷ S	1,14	1,96	11,15	386	0,0526
FZB24 10 ⁷ S+B	1,08	1,61	8,88	282	0,0591
FZB24 10 ⁸ S	1,04	1,59	9,85	401	0,0469
FZB24 10 ⁸ S+B	1,28	1,41	11,98	281	0,0393
FZB24 10 ⁹ S	1,21	1,98	10,56	369	0,0462
FZB24 10 ⁹ S+B	0,90	1,00	6,32	112	0,0249
FZB27 10 ⁷ S	1,19	1,43	10,51	281	0,0458
FZB27 10 ⁷ S+B	0,87	1,14	9,23	267	0,0415
FZB27 10 ⁸ S	0,95	1,54	9,89	354	0,0534
FZB27 10 ⁸ S+B	1,26	2,13	11,09	392	0,0481
FZB27 10 ⁹ S	0,94	1,43	9,74	269	0,0509
FZB27 10 ⁹ S+B	0,84	1,14	7,91	239	0,0365
GD (HSD) 0,05	0,49	n.s.	2,79	n.s.	n.s.

Tab.10: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer bei 25 °C

FM = Frischmasse

TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	Wurzel- länge [cm]	TM Wurzel [g]
Kontrolle	1,97	0,77	10,50	235	0,0335
FZB24 10 ⁷ S	2,31	0,74	11,99	317	0,0342
FZB24 10 ⁷ S+B	2,19	0,70	12,73	329	0,0403
FZB24 10 ⁸ S	2,32	0,77	11,84	312	0,0347
FZB24 10 ⁸ S+B	2,30	0,78	12,69	294	0,0361
FZB24 10 ⁹ S	2,40	0,78	12,71	280	0,0318
FZB24 10 ⁹ S+B	2,75	0,72	13,41	198	0,0336
FZB27 10 ⁷ S	2,26	0,72	12,60	305	0,0361
FZB27 10 ⁷ S+B	2,42	0,68	12,60	314	0,0369
FZB27 10 ⁸ S	2,21	0,76	11,20	338	0,0374
FZB27 10 ⁸ S+B	2,25	0,74	12,86	334	0,0402
FZB27 10 ⁹ S	2,43	0,80	12,85	321	0,0325
FZB27 10 ⁹ S+B	3,03	0,74	13,05	288	0,0309
Kaliumnitrat	2,41	0,56	13,07	209	0,0208
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	2,14	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Aus den Tabellen 7-10 geht hervor, dass die Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Varianten bei höheren Versuchstemperaturen geringer sind als bei 10 °C. Bereits bei 15 °C (Tab.8) war eine deutlich größere Biomasseproduktion der Erbsenpflanzen zu verzeichnen als bei 10 °C, was sich besonders in wesentlich erhöhten Spross- und Wurzellängen dokumentiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten zeigten sich bei 15 °C bei keinem der untersuchten Wachstumsparameter. Bei

Steigerung der Versuchstemperatur auf 20 °C reagierten die Erbsenpflanzen vor allem mit einer Erhöhung der Frischmassen von Spross und Wurzel sowie der Wurzeltrockenmasse (Tab.9). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten gab es kaum. Auch eine tendenzielle Verbesserung des Pflanzenwachstums trat weitaus weniger deutlich zutage als bei 10 °C. Bei 25 °C wiesen die Testpflanzen geringere Frisch- und Trockenmassen auf als bei 20 °C. Die dagegen deutlich höheren Sprossfrischmassen rührten von der fortgeschrittenen Fruchtbildung her. Positive Wachstumseffekte der durchgeführten Behandlungen kamen hier wieder deutlicher zum Ausdruck, auch wenn diese kaum statistisch gesichert werden konnten. Die Applikation von *Bacillus subtilis* mit einer Sporensuspension von 10^9 cfu / ml als Saatgut- und Substratbehandlung hatte bei 25 °C nicht den negativen Effekt wie bei niedrigeren Temperaturen.

Die zusammenfassende Tab.11 zeigt, dass die Sprossfrischmassen der Erbsenpflanzen im Mittel der Versuche durch die Behandlungen ausnahmslos erhöht wurden, wobei die Werte bis zu 39 % (FZB27 10^9 S+B) über denen der unbehandelten Kontrolle lagen. Eine ähnlich fördernde Wirkung der *Bacillus subtilis*-Applikationen wurde bei der Sprosslänge festgestellt. Lediglich bei einer einfachen Saatgutbehandlung mit FZB24® 10^7 cfu / ml lagen die Sprosslängen im Mittel geringfügig unter dem Kontrollwert. Auch die Behandlung mit Kaliumnitrat führte zu einer Erhöhung von Sprosslänge und Sprossfrischmasse.

Die Wurzelfrischmassen wurden bei den meisten Varianten weniger stark gefördert. Insbesondere bei kombinierter Anwendung von *Bacillus subtilis* in einer Konzentration von 10^9 cfu / ml wurden sowohl Wurzelfrischmasse als auch Wurzelgesamtlänge verringert. Dies trifft insbesondere für *Bacillus subtilis* FZB24® zu. Jedoch führte auch eine alleinige Applikation des Trägerstoffes Kaliumnitrat zu einer deutlichen Reduktion von Wurzelfrischmasse und Wurzellänge.

Unterschiede zwischen beiden verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämmen hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Pflanzenwachstum sind anhand der ermittelten Wachstumsparameter nicht klar zu erkennen.

Tab.11: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer [% zur Kontrolle]

FM = Frischmasse

TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross	FM Wurzel	Spross- länge	Wurzel- länge	TM Wurzel
Kontrolle	100	100	100	100	100
FZB24 10^7 S	102	108	95	147	112
FZB24 10^7 S+B	111	133	111	122	125
FZB24 10^8 S	121	108	116	126	107
FZB24 10^8 S+B	136	108	126	113	118
FZB24 10^9 S	125	111	121	119	115
FZB24 10^9 S+B	116	73	108	54	65
FZB27 10^7 S	114	94	110	112	105
FZB27 10^7 S+B	117	98	113	130	115
FZB27 10^8 S	116	96	108	121	109
FZB27 10^8 S+B	138	130	121	147	124
FZB27 10^9 S	122	116	111	137	120
FZB27 10^9 S+B	139	96	105	94	89
Kaliumnitrat	127	85	111	80	83

Aus den Abb.7 und 8 geht hervor, dass die Sprossfrischmasse durch die *Bacillus subtilis* FZB24[®]-Behandlung wie auch durch die alleinige Anwendung von Kaliumnitrat stärker erhöht wurde als die Wurzelfrischmasse. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten traten bei der niedrigen Temperatur (10 °C) meist stärker zutage als bei der höheren (25 °C). Des Weiteren war die prozentuale Wachstumsförderung bei 10 °C bis auf eine Ausnahme (kombinierte Anwendung von *Bacillus subtilis* in einer Konzentration von 10^9 cfu / ml) deutlich größer als bei 25 °C. Bei einer Temperatur von

25 °C war kaum eine Erhöhung der Wurzelfrischmasse durch die Behandlungen erkennbar. Die ermittelten Werte lagen nahe jenen der Kontrolle oder darunter, wobei durch die alleinige Anwendung von Kaliumnitrat die Wurzelfrischmasse am stärksten reduziert wurde. Die besten Wachstumseffekte wurden durch eine kombinierte Anwendung von *Bacillus subtilis* in einer Konzentration von 10^8 cfu / ml erzielt. Lediglich bei einer Temperatur von 25 °C wurden bei kombinierter Anwendung von *Bacillus subtilis* 10^9 cfu / ml die größten Sprossfrischmassen ermittelt.

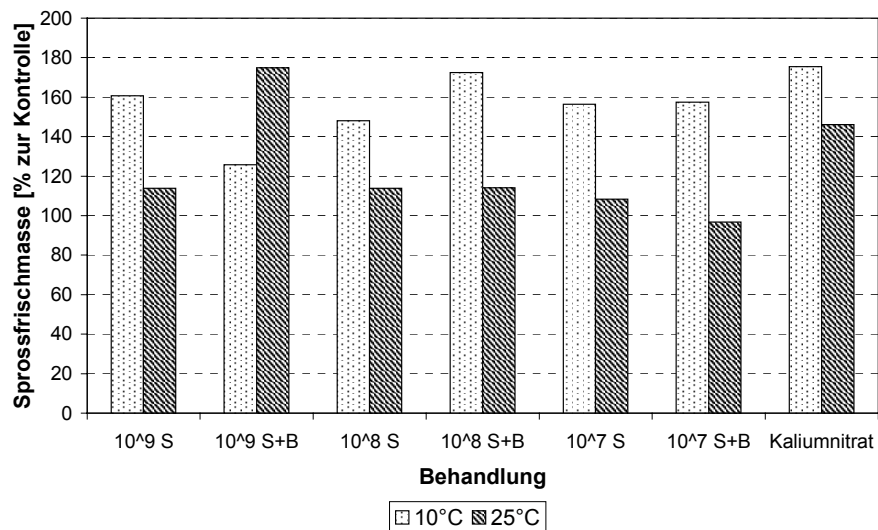


Abb.7: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis* FZB24[®]-Behandlungen auf die Sprossfrischmassen von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer bei 2 Temperaturstufen [% zur Kontrolle]
 S = Saatgutbehandlung
 S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

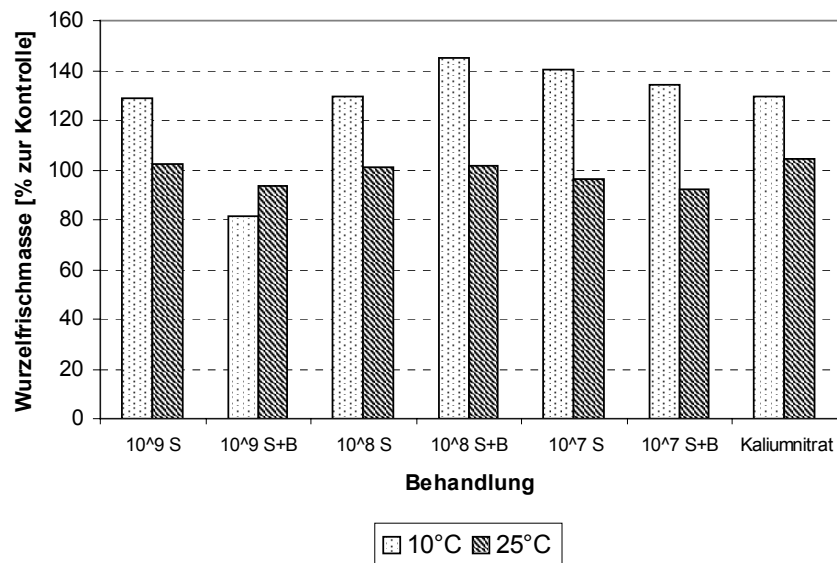


Abb.8: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis* FZB24[®]-Behandlungen auf die Wurzelfrischmassen von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer bei 2 Temperaturstufen [% zur Kontrolle]

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

4.2 Versuchsserie 2

4.2.1 Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis*

Die Keimzahl von *Bacillus subtilis* lag auf der Oberfläche eines behandelten Erbsensamens knapp drei Zehnerpotenzen unter dem behandelten Titer, also in den meisten Fällen etwas über 10^5 cfu / Erbse. Bei allen drei Trägerstoffen lagen diese Werte etwa gleich hoch. Bei *Bacillus subtilis* FZB27 hafteten geringfügig mehr Sporen des Nutzbakteriums am behandelten Saatgut an als bei FZB47. Bei den Trägerstoffen Kaliumnitrat und Maisstärke war dieser Unterschied auch statistisch abzusichern (Abb.9).

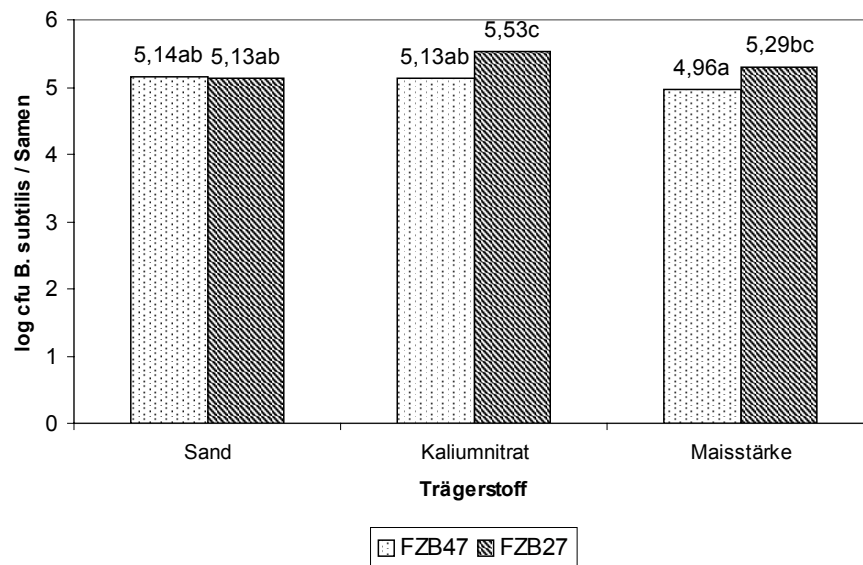


Abb.9: Mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche mit einer Sporensuspension der Konzentration 10^8 cfu / ml behandeltem Erbsensaatgut bei Verwendung verschiedener Trägerstoffe

Die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Bereich der Rhizosphäre wies eine starke Abhängigkeit von der Temperatur während des Versuchszeitraumes auf, insbesondere dann, wenn ausschließlich das Saatgut mit dem Bakterium behandelt worden war (Abb.10 und 11).

Bei dem Stamm FZB47 wuchs die Besiedlungsdichte deutlich mit steigender Temperatur. Ausnahme: *Bacillus subtilis* auf Sand (Saatgutbehandlung) - hier wurde bei 20 °C die höchste Keimzahl ermittelt. Bei Kombination von Saatgut- und Substratbehandlung wurden generell höhere Populationsdichten des Nutzbakteriums in der Rhizosphäre festgestellt als bei alleiniger Saatgutapplikation. Die Temperaturabhängigkeit kam in diesem Fall jedoch nicht so deutlich zum Tragen. Das bedeutet, dass die Unterschiede in der Populationsdichte zwischen beiden Applikationsformen bei niedriger Temperatur besonders auffällig waren.

So wurden beispielsweise bei FZB47 auf Maisstärke (Saatgutbehandlung) bei 15 °C Keimzahlen von weniger als 10^5 cfu / g Wurzeltrockenmasse ermittelt, bei 25 °C erreichten diese mehr als 10^7 cfu / g Wurzeltrockenmasse. Bei kombinierter Anwendung (Saatgut- und Substratapplikation) hingegen hatte die Temperatur während des Versuchszeitraumes keinen entscheidenden Einfluss. Hier bewegten sich die

Keimzahlen von *Bacillus subtilis* bei allen drei Temperaturstufen zwischen 10^7 und 10^8 cfu / g Wurzeltrockenmasse.

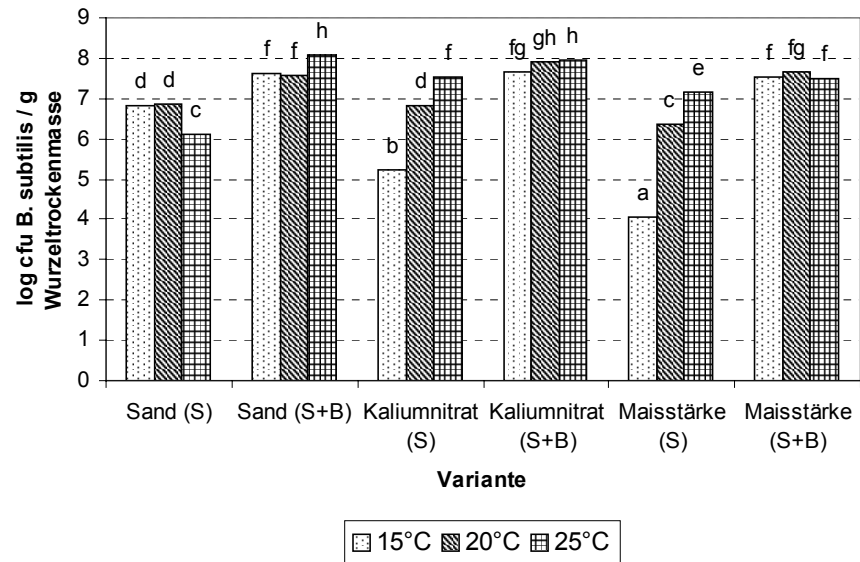


Abb.10: Einfluss der Temperatur auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 auf verschiedenen Trägerstoffen an Erbsenwurzeln

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung

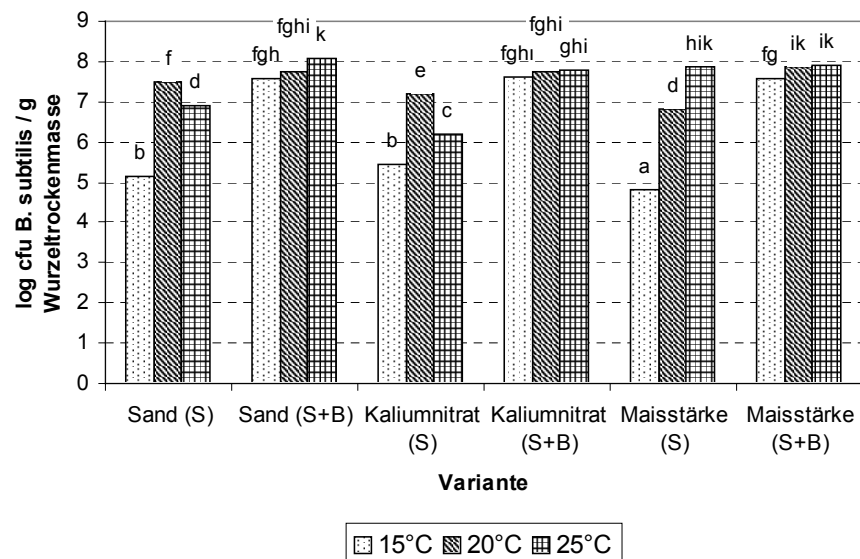


Abb.11: Einfluss der Temperatur auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB27 auf verschiedenen Trägerstoffen an Erbsenwurzeln

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung

Im Rhizosphärenbereich erwies sich die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* als weitgehend unabhängig vom jeweils verwendeten Trägerstoff. Das Verhalten des Stammes FZB27 ähnelte im Wesentlichen dem des vorher beschriebenen FZB47 (Abb.11).

Beim Vergleich der Populationsdichten dieser Versuchsserie mit Versuchsserie 1, die komplett ohne Pathogen durchgeführt wurde, am Beispiel des Stammes FZB27 (jeweils gleiche Konzentration und gleicher Trägerstoff) zeigten sich in den Versuchen ohne Pathogen meist die etwas höheren Keimzahlen. Wie aus Abb.12 hervorgeht, war dieser Unterschied oftmals auch statistisch abzusichern.

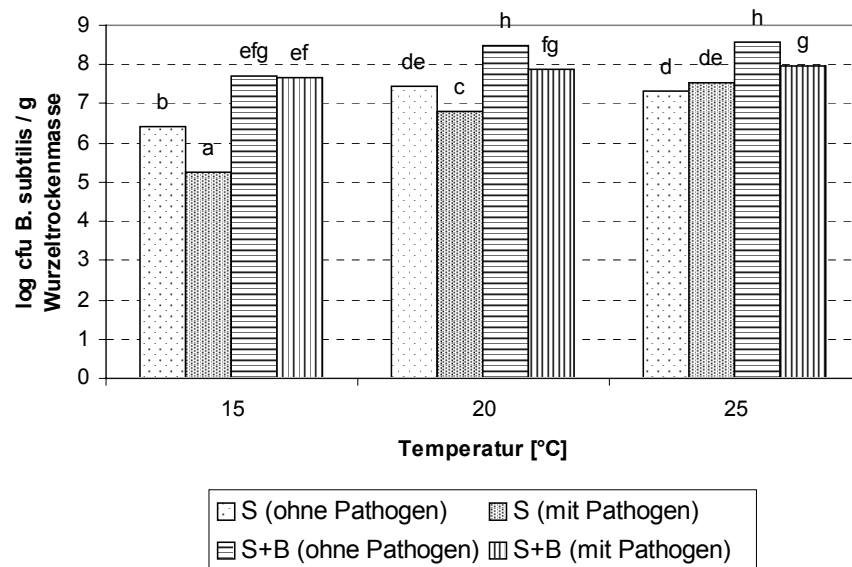


Abb.12: Vergleich der Populationsdichten von *Bacillus subtilis* FZB27 ohne und mit Anwesenheit des Pilzes *Phoma pinodella* an Erbsenwurzeln

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung

Das Verhalten von *Bacillus subtilis* im Substrat ähnelte dem im Wurzelbereich (Tab.12 und 13). Bei FZB47 führte bei alleiniger Saatgutbehandlung jede Steigerung der Versuchstemperatur um 5 °C zu einer signifikanten Erhöhung der Populationsdichte des Nutzbakteriums. Bei FZB27 war ein ähnlicher Effekt zu beobachten, wobei hier besonders zwischen 15 °C und 20 °C große Differenzen erkennbar wurden. Bei Verwendung der Trägerstoffe Kaliumnitrat und Maisstärke lagen die Keimzahlen bei 20 °C um mehr als zwei Zehnerpotenzen über den bei 15 °C ermittelten. Dagegen kam

es bei kombinierter Anwendung bei beiden *Bacillus subtilis*-Stämme durch Veränderung der Versuchstemperatur zu sehr geringen Unterschieden in der Populationsdichte des Bakteriums. Diese bewegten sich prinzipiell unterhalb einer Zehnerpotenz und waren nur selten signifikant. Bei kombinierter Anwendung wurden grundsätzlich höhere Besiedlungsdichten ermittelt als bei alleiniger Saatgutbehandlung. Die Verwendung unterschiedlicher Trägerstoffe führten nur bei alleiniger Saatgutbehandlung zu nennenswerten Differenzen in der Populationsdichte bei jeweils gleicher Temperaturstufe. Jedoch ist auch hier kein eindeutiger Trend erkennbar, ob die Verwendung eines bestimmten Trägerstoffes eine größere Besiedlungsdichte im Substrat zur Folge hat. Beim Vergleich der beiden verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämme zeigten sich bei FZB27 zumeist etwas höhere Keimzahlen als bei FZB47, im Besonderen auffällig bei alleiniger Saatgutbehandlung, außer bei der Verwendung von Sand als Trägerstoff.

Tab.12: Einfluss verschiedener Trägerstoffe auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 in Quarzsand nach 30 Tagen [log cfu / g]

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	15 °C		20 °C		25 °C	
Sand (S)	2,52	b	3,14	c	4,23	e
Sand (S+B)	5,57	gh	5,49	gh	5,73	h
Kaliumnitrat (S)	1,96	a	4,08	e	4,11	e
Kaliumnitrat (S+B)	5,54	gh	6,09	i	6,11	i
Maisstärke (S)	2,06	a	3,65	d	5,11	f
Maisstärke (S+B)	5,32	fg	5,40	fg	5,61	gh

Tab.13: Einfluss verschiedener Trägerstoffe auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB27 in Quarzsand nach 30 Tagen [log cfu / g]

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	15 °C	20 °C	25 °C
Sand (S)	2,49 b	4,43 d	3,91 c
Sand (S+B)	5,65 ikl	5,27 gh	5,67 ikl
Kaliumnitrat (S)	2,31 ab	4,84 ef	4,81 e
Kaliumnitrat (S+B)	5,63 ikl	5,29 gh	5,88 l
Maisstärke (S)	2,08 a	4,85 ef	5,16 fg
Maisstärke (S+B)	5,55 hik	5,46 ghi	5,84 kl

4.2.2 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das Pflanzenwachstum

Bei Betrachtung der in den Tabellen 14-16 dargestellten vegetativen Parameter fällt auf, dass die Inokulation mit *Phoma pinodella* das Wachstum der Erbsenpflanzen entscheidend hemmte. Das drückt sich darin aus, dass bei der mit *Phoma pinodella* inokulierten Kontrolle für alle vegetativen Parameter bei allen Temperaturstufen niedrigere Werte ermittelt wurden als bei der nicht inokulierten Kontrolle. Diese negativen Wachstumseffekte konnten durch die Behandlungen mit *Bacillus subtilis* teilweise kompensiert werden. Die meisten signifikanten Unterschiede ergaben sich dabei bei einer Versuchstemperatur von 15 °C, die wenigsten bei 25 °C. Wachstumsunterschiede zwischen den Pflanzen der einzelnen Varianten traten also besonders deutlich bei niedriger Temperatur zutage. Bei Erhöhung der Versuchstemperatur von 15 °C auf 20 °C reagierten die Testpflanzen mit einer deutlich stärkeren Biomasseproduktion im Verlauf der 30 Tage Versuchsdauer, insbesondere im Sprossbereich. Bei Temperaturerhöhung von 20 °C auf 25 °C war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, eine weitere Steigerung der Biomasseproduktion dokumentiert sich im Wesentlichen in den größeren Trockenmassen von Spross und Wurzel.

Aus der zusammenfassenden Tab.17 geht hervor, dass sich die meisten Behandlungen mit *Bacillus subtilis* im Vergleich zur inokulierten Kontrolle positiv auf das Wachstum der Erbsenpflanzen auswirkten. Dieser Effekt wurde besonders deutlich bei Betrachtung der Wurzelfrischmasse. Hier lag keine Variante unter der inokulierten Kontrolle. Allgemein wachstumsfördernde Effekte wurden beispielsweise durch die kombinierte Anwendung des Nutzbakteriums bei Formulierung auf Kaliumnitrat erzielt (sowohl bei FZB47 als auch bei FZB27) sowie durch eine alleinige Saatgutbehandlung mit FZB47 auf Sand formuliert. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch keine allgemein gültige Aussage zu, inwiefern durch die Verwendung eines bestimmten Trägerstoffes die positiven Wachstumseffekte einer *Bacillus subtilis*-Applikation verstärkt werden. Zu bemerken ist außerdem, dass die wachstumsfördernde Wirkung durch *Bacillus subtilis* gegenüber der mit *Phoma pinodella* inokulierten Kontrolle recht gering war, sich in der Mehrzahl der Fälle unter 20 % bewegte und in der Regel nicht statistisch gesichert werden konnte, wie aus den Tabellen 14-16 hervorgeht. Dies ist ein Hinweis auf die starke Streuung der Werte. Durch eine zusätzliche Behandlung des Substrates mit den Bakterien konnte keine durchweg bessere Wirkung erzielt werden.

Tab.14: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach Inokulation mit *Phoma pinodella* bei 15 °C

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	0,78	0,84	9,5	0,0617	0,0400
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	0,55	0,61	6,9	0,0418	0,0326
FZB47 Sand (S)	0,62	0,75	7,6	0,0503	0,0373
FZB47 Sand (S+B)	0,52	0,56	7,0	0,0402	0,0280
FZB47 Kaliumnitrat (S)	0,54	0,53	6,5	0,0415	0,0263
FZB47 Kaliumnitrat (S+B)	0,62	0,61	7,5	0,0479	0,0297
FZB47 Maisstärke (S)	0,56	0,56	6,8	0,0468	0,0257
FZB47 Maisstärke (S+B)	0,58	0,65	6,8	0,0465	0,0315
FZB27 Sand (S)	0,49	0,49	6,3	0,0399	0,0261
FZB27 Sand (S+B)	0,60	0,65	7,3	0,0482	0,0308
FZB27 Kaliumnitrat (S)	0,41	0,44	5,4	0,0339	0,0235
FZB27 Kaliumnitrat (S+B)	0,65	0,69	7,9	0,0515	0,0409
FZB27 Maisstärke (S)	0,46	0,38	5,8	0,0388	0,0255
FZB27 Maisstärke (S+B)	0,56	0,62	6,9	0,0471	0,0324
GD (HSD) 0,05	0,23	0,40	2,3	0,0207	n.s.

Tab.15: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach Inokulation mit *Phoma pinodella* bei 20 °C

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	1,16	0,74	11,7	0,0873	0,0228
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	0,89	0,38	10,3	0,0698	0,0218
FZB47 Sand (S)	0,90	0,69	10,6	0,0655	0,0422
FZB47 Sand (S+B)	0,76	0,50	9,2	0,0575	0,0203
FZB47 Kaliumnitrat (S)	0,92	0,62	10,5	0,0734	0,0277
FZB47 Kaliumnitrat (S+B)	0,85	0,66	10,0	0,0674	0,0284
FZB47 Maisstärke (S)	0,86	0,39	9,9	0,0811	0,0222
FZB47 Maisstärke (S+B)	0,84	0,55	10,5	0,0722	0,0327
FZB27 Sand (S)	0,89	0,69	10,7	0,0768	0,0387
FZB27 Sand (S+B)	0,75	0,60	9,9	0,0700	0,0208
FZB27 Kaliumnitrat (S)	0,85	0,48	10,0	0,0701	0,0189
FZB27 Kaliumnitrat (S+B)	1,04	0,58	11,3	0,0897	0,0283
FZB27 Maisstärke (S)	0,86	0,60	10,0	0,0748	0,0290
FZB27 Maisstärke (S+B)	0,83	0,56	10,0	0,0753	0,0323
GD (HSD) 0,05	0,35	n.s.	n.s.	0,0254	n.s.

Tab.16: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach Inokulation mit *Phoma pinodella* bei 25 °C

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	1,07	0,52	9,7	0,1048	0,0468
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	0,93	0,38	9,0	0,0892	0,0269
FZB47 Sand (S)	1,04	0,59	9,8	0,1019	0,0383
FZB47 Sand (S+B)	0,98	0,43	9,7	0,0957	0,0367
FZB47 Kaliumnitrat (S)	0,95	0,55	9,3	0,1070	0,0394
FZB47 Kaliumnitrat (S+B)	0,86	0,43	9,7	0,0873	0,0525
FZB47 Maisstärke (S)	0,94	0,48	9,7	0,0946	0,0548
FZB47 Maisstärke (S+B)	0,97	0,47	10,1	0,1023	0,0361
FZB27 Sand (S)	0,90	0,50	9,8	0,0949	0,0594
FZB27 Sand (S+B)	0,95	0,60	10,2	0,0967	0,0423
FZB27 Kaliumnitrat (S)	1,05	0,65	10,1	0,1099	0,0700
FZB27 Kaliumnitrat (S+B)	1,10	0,48	10,8	0,1173	0,0558
FZB27 Maisstärke (S)	0,85	0,39	9,4	0,0889	0,0341
FZB27 Maisstärke (S+B)	0,89	0,39	9,1	0,1112	0,0374
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0,0373

Tab.17: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach Inokulation mit *Phoma pinodella* [% zur inokulierten Kontrolle]

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross	FM Wurzel	Spross- länge	TM Spross	TM Wurzel
Kontrolle (unbehandelt)	129	137	120	136	104
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	100	100	100	100	100
FZB47 Sand (S)	109	132	107	107	193
FZB47 Sand (S+B)	95	104	99	89	93
FZB47 Kaliumnitrat (S)	102	118	100	102	127
FZB47 Kaliumnitrat (S+B)	100	116	104	106	130
FZB47 Maisstärke (S)	100	101	101	114	102
FZB47 Maisstärke (S+B)	102	116	104	107	150
FZB27 Sand (S)	95	112	101	103	178
FZB27 Sand (S+B)	99	116	105	108	96
FZB27 Kaliumnitrat (S)	94	106	95	91	87
FZB27 Kaliumnitrat (S+B)	118	122	114	126	130
FZB27 Maisstärke (S)	90	100	95	100	133
FZB27 Maisstärke (S+B)	97	107	99	110	148

4.2.3 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen

Der Krankheitsbefall der Erbsenpflanzen wurde in Form des Krankheitsindex dargestellt (Tab.18). Es zeigte sich, dass auch in der nicht inokulierten Kontrolle jeweils ein geringer spontaner Krankheitsbefall im Bereich von Hypokotyl und Wurzeln auftrat, der nicht auf *Phoma pinodella* zurückzuführen und bei 15 °C geringer war als bei 20 °C und 25 °C. Durch Inokulation mit dem phytopathogenen Pilz *Phoma pinodella* ohne zusätzliche Behandlung mit *Bacillus subtilis* wurde der Krankheitsindex gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei allen Temperaturstufen signifikant erhöht und bewegte sich zwischen 43,8 % bei 25 °C und 69,1 % bei 20 °C. Durch Applikation von *Bacillus subtilis* konnte der Krankheitsindex um bis zu 23,1 % verringert werden. Bei einer Versuchstemperatur von 15 °C wurde bei allen Varianten mit Bakterienbehandlung mit einer Ausnahme (FZB27 auf Kaliumnitrat, Saatgutapplikation) ein geringerer Krankheitsbefall als in der inokulierten Kontrolle festgestellt, der jedoch in keinem Fall statistisch gesichert werden konnte. Bei 20 °C wurde bei zwei Varianten ein geringfügig höherer Krankheitsbefall festgestellt als bei der inokulierten Kontrolle, bei 25 °C traf dies auf drei Varianten zu. Eine zusätzliche Substratbehandlung mit *Bacillus subtilis* führte nicht in jedem Fall zu einer weiteren Reduktion des Krankheitsbefalls. Bei den jeweils zwei Varianten bei 20 °C bzw. 25 °C, bei denen die Verringerung des Krankheitsindex gegenüber der inokulierten Kontrolle statistisch zu sichern war, war das Bakterium jedoch als kombinierte Saatgut- und Substratbehandlung angewendet worden. Zusammengefasst über alle Temperaturstufen zeigte sich, dass im Vergleich zur inokulierten Kontrolle mit einer Ausnahme (FZB47 auf Kaliumnitrat, Saatgut- und Substratapplikation) alle *Bacillus subtilis*-Behandlungen zu geringeren Krankheitsindizes führten. Eine Reduktion des Krankheitsbefalls auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle wurde nicht erreicht. Im Hinblick auf die Beeinflussung des Gesundheitszustandes der Testpflanzen nach Inokulation mit *Phoma pinodella* verhielten sich beide *Bacillus subtilis*-Stämme auf allen drei geprüften Trägerstoffen ähnlich.

Tab.18: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf den Krankheitsbefall von Erbsenpflanzen nach Inokulation mit *Phoma pinodella* [Krankheitsindex in %, Spalte Gesamt: Krankheitsbefall in % zur inokulierten Kontrolle]
Signifikante Unterschiede gegenüber der inokulierten Kontrolle sind bei den drei Temperaturstufen mit „*“ gekennzeichnet (nach Kruskal-Wallis-H-Test).

Variante	15 °C	20 °C	25 °C	Gesamt
Kontrolle (unbehandelt)	2,7 *	10,0 *	9,5 *	13,6
inokulierte Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	56,7	69,1	43,8	100,0
FZB47 Sand (S)	47,8	59,5	33,2	82,1
FZB47 Sand (S+B)	49,8	67,3	34,3	87,9
FZB47 Kaliumnitrat (S)	48,8	61,0	44,3	91,9
FZB47 Kaliumnitrat (S+B)	50,1	70,5	57,1	107,0
FZB47 Maisstärke (S)	45,3	78,3	43,1	97,2
FZB47 Maisstärke (S+B)	45,7	61,3	36,5 *	84,2
FZB27 Sand (S)	51,0	62,6	41,0	91,4
FZB27 Sand (S+B)	49,0	65,3	38,3	89,6
FZB27 Kaliumnitrat (S)	56,7	61,9	39,8	93,6
FZB27 Kaliumnitrat (S+B)	47,1	51,4 *	32,1 *	76,9
FZB27 Maisstärke (S)	47,3	61,3	53,3	98,0
FZB27 Maisstärke (S+B)	44,8	51,7 *	38,2	80,4

4.3 Versuchsserie 3

4.3.1 Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis*

Die Zahl anhaftender Keime von *Bacillus subtilis* an den behandelten Erbsensamen lag bei dieser Versuchsreihe etwas mehr als zwei Zehnerpotenzen unter dem angewandten Titer (Abb.13). Es hafteten geringfügig mehr Keime des Nutzbakteriums an den Samen als bei der vorangegangenen Versuchsserie. Im Gegensatz zu dieser wurden hier auch die etwas höheren Keimzahlen an den mit FZB47 behandelten Samen gefunden. Bei einem angewandten Titer von 10^8 cfu / ml war dieser Unterschied signifikant.

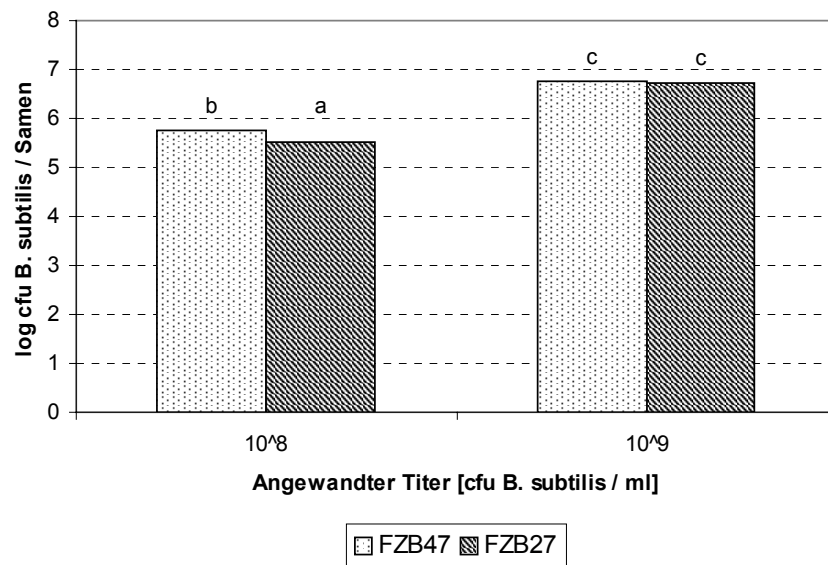


Abb.13: Mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* FZB47 und FZB27 auf der Oberfläche von behandeltem Erbsensaatgut bei Versuchsserie 3

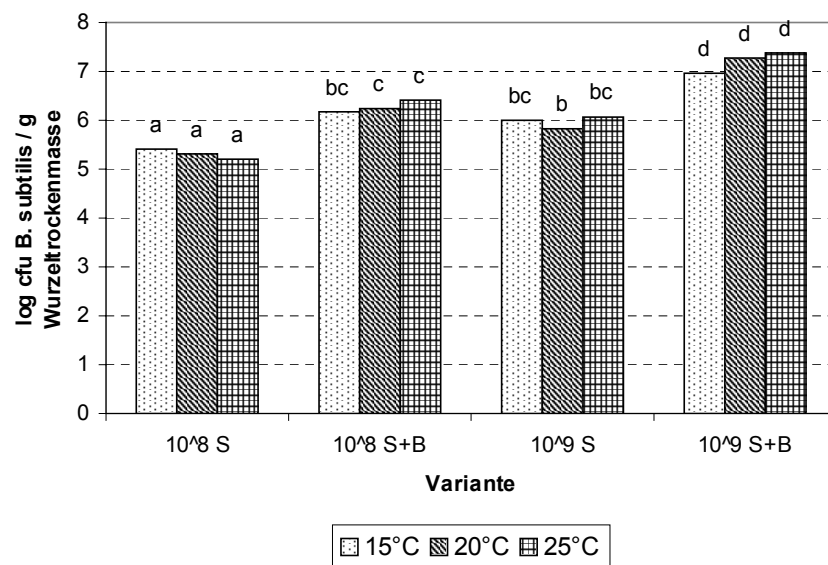


Abb.14: Einfluss der Temperatur, der Art der Applikation und des angewandten Titers auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 an Erbsenwurzeln in Feldboden nach 30 Tagen

S = Saatgutbehandlung; S+B = Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung

Aus der in Abb.14 gezeigten Populationsdichte von *Bacillus subtilis* an Erbsenwurzeln geht hervor, dass auch in Feldboden die Keimzahlen des Nutzbakteriums an der Pflanzenwurzel in Abhängigkeit von der eingebrachten Ausgangskonzentration nach 30 Tagen noch deutliche Unterschiede aufwiesen. Bei beiden verwendeten

Konzentrationen der Sporensuspension wurde die jeweils signifikant höhere Besiedlungsdichte bei kombinierter Anwendung (Saatgut- und Substratapplikation) im Vergleich zur einfachen Saatgutbehandlung ermittelt. Die bei Saatgutbehandlung mit 10^9 cfu / ml ermittelten Werte unterscheiden sich nur wenig von denen bei kombinierter Anwendung mit 10^8 cfu / ml. Durch Erhöhung der Temperatur kam es in keinem Fall zu einer signifikant höheren Keimzahl von *Bacillus subtilis* an den Pflanzenwurzeln.

Abb.15 gibt wieder, dass die Besiedlungsdichte des Nutzbakteriums durch Inokulation mit *Phoma pinodella* mit zwei Ausnahmen nicht negativ beeinflusst wurde. In vier von sechs Fällen lag die Keimzahl von *Bacillus subtilis* bei Anwesenheit des Pathogens sogar knapp über jener in den entsprechend nicht inokulierten Varianten. Bei alleiniger Saatgutbehandlung mit FZB47, 10^8 cfu / ml, war dieser Unterschied signifikant.

Beim Vergleich der Populationsdichte des mikrobiellen Antagonisten an Pflanzenwurzeln in Quarzsand und in Feldboden (Abb.16) zeigte sich prinzipiell die gleiche Tendenz, dass die Besiedlungsdichte des Nutzbakteriums abhängig war von der introduzierten Keimzahl und dass sich die höhere eingebrachte Keimzahl noch nach 30 Tagen Versuchsdauer in einer höheren Populationsdichte an den Wurzeln niederschlug. Bei Betrachtung der absoluten Werte war die Besiedlungsdichte an den Wurzeln im Vergleich beider Substrate jedoch sehr unterschiedlich. Die klar höheren Werte wurden hier durchweg im Quarzsand ermittelt, auch bei geringerer introduzierter Keimzahl und niedrigerer Versuchstemperatur. In den entsprechenden Varianten lag die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* an Pflanzenwurzeln in Quarzsand um wenigstens zwei Zehnerpotenzen höher als in Feldboden. Durch die Temperatur hervorgerufene Unterschiede erschienen beim Vergleich von 20 °C und 25 °C bei beiden Substraten gering.

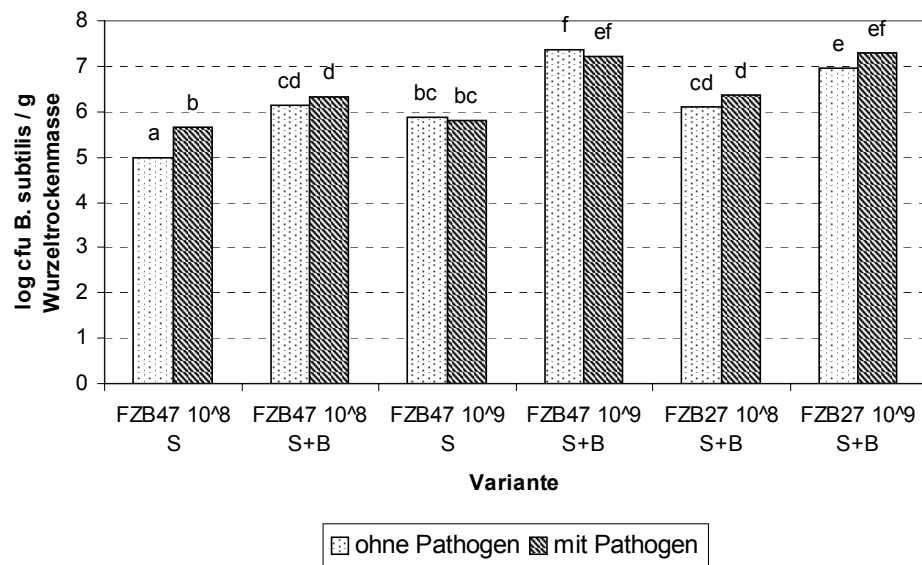


Abb.15: Einfluss einer Inokulation mit *Phoma pinodella* auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* an Erbsenwurzeln in Feldboden bei 20 °C

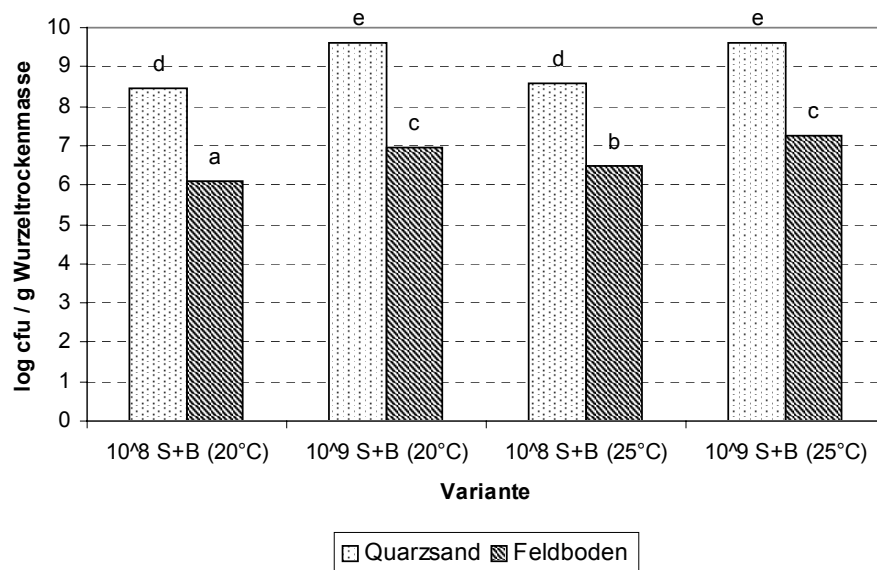


Abb.16: Vergleich der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* FZB27 an Erbsenwurzeln in Quarzsand und in Feldboden bei zwei Temperaturstufen und unterschiedlicher introduzierter Keimzahl
S = Saatgutbehandlung; S+B = Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung

Die Betrachtung des Verhaltens von *Bacillus subtilis* im Substrat (hier: Feldboden) führte zu ähnlichen Ergebnissen wie im Bereich der Pflanzenwurzeln. Der entscheidende Faktor für die Beeinflussung der Populationsdichte des Nutzbakteriums war auch im Substrat die zu Versuchsbeginn durch Saatgut- bzw. Substratbehandlung

eingebraachte Keimzahl. Insbesondere eine zusätzliche Substratapplikation resultierte in zwei bis drei Zehnerpotenzen höheren Besiedlungsdichten als bei einfacher Saatgutbehandlung. Demgegenüber war der Einfluss der Versuchstemperatur sehr gering, nur selten ergaben sich statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den einzelnen Temperaturstufen. War bei Erhöhung der Temperatur von 15 °C auf 20 °C zumeist eine tendenzielle Erhöhung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* im Substrat festzustellen, so fiel diese bei 25 °C mit einer Ausnahme (FZB47 bei alleiniger Saatgutbehandlung mit 10^8 cfu / ml und Pathogen-Inokulation) wieder etwas ab. Das Verhalten sowie die Größenordnung, in denen sich die Keimzahlen des Nutzbakteriums im Substrat bewegten, waren im Vergleich der Stämme FZB47 (Tab.19) und FZB27 (Tab.20) kaum unterschiedlich. Die Inokulation mit *Phoma pinodella* hatte ebenfalls nur geringen Einfluss auf das populationsdynamische Verhalten von *Bacillus subtilis*. Während bei Pathogen-Inokulation zumeist etwas geringere Besiedlungsdichten bei FZB27 ermittelt wurden als ohne Pathogen, waren die ermittelten Keimzahlen von FZB47 mit Pathogen oftmals geringfügig höher als ohne.

Allgemein war in Feldboden die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Substrat geringer als im Wurzelbereich. Allerdings war dieser Unterschied weniger deutlich erkennbar als in Quarzsand.

Tab.19: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 in Feldboden nach 30 Tagen
[log cfu / g]

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	15 °C	20 °C	25 °C
10 ⁸ S	3,62 b	3,81 bc	3,35 a
10 ⁸ S / P	3,81 bc	4,17 ef	4,83 g
10 ⁸ S+B	5,63 hi	5,50 h	4,75 g
10 ⁸ S+B / P	5,55 hi	5,77 i	5,53 hi
10 ⁹ S	3,83 bcd	4,09 def	3,95 cde
10 ⁹ S / P	3,88 bcd	4,28 f	4,16 ef
10 ⁹ S+B	6,53 k	6,50 k	6,30 k
10 ⁹ S+B / P	6,44 k	6,46 k	6,34 k

Tab.20: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB27 in Feldboden nach 30 Tagen
[log cfu / g]

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	15 °C	20 °C	25 °C
10 ⁸ S+B	5,26 ab	6,05 d	5,46 bc
10 ⁸ S+B / P	5,30 ab	5,75 c	5,13 a
10 ⁹ S+B	6,41 ef	6,66 f	6,32 de
10 ⁹ S+B / P	6,48 ef	6,47 ef	6,30 de

Beim in Abb.17 gezeigten Vergleich des Verhaltens von *Bacillus subtilis* FZB27 in Quarzsand und Feldboden wurden – ähnlich wie im Wurzelbereich – die deutlich höheren Populationsdichten in Quarzsand ermittelt. Jedoch beträgt dieser in jedem Fall signifikante Unterschied hier weniger als zwei Zehnerpotenzen, ist also etwas geringer als an den Pflanzenwurzeln (Abb.16). Sowohl in Feldboden als auch in Quarzsand führte eine Erhöhung der introduzierten Keimzahl von *Bacillus subtilis* zu signifikant

höheren Besiedlungsdichten am Versuchsende. Im Gegensatz dazu wurde die Populationsdichte des Bakteriums im Feldboden durch die Versuchstemperatur nicht beeinflusst. In Quarzsand dagegen kam es durch Steigerung der Versuchstemperatur auch zu einer erhöhten Keimzahl im Substrat. Bei einem angewandten Titer von 10^8 cfu / ml war dieser Unterschied statistisch zu sichern.

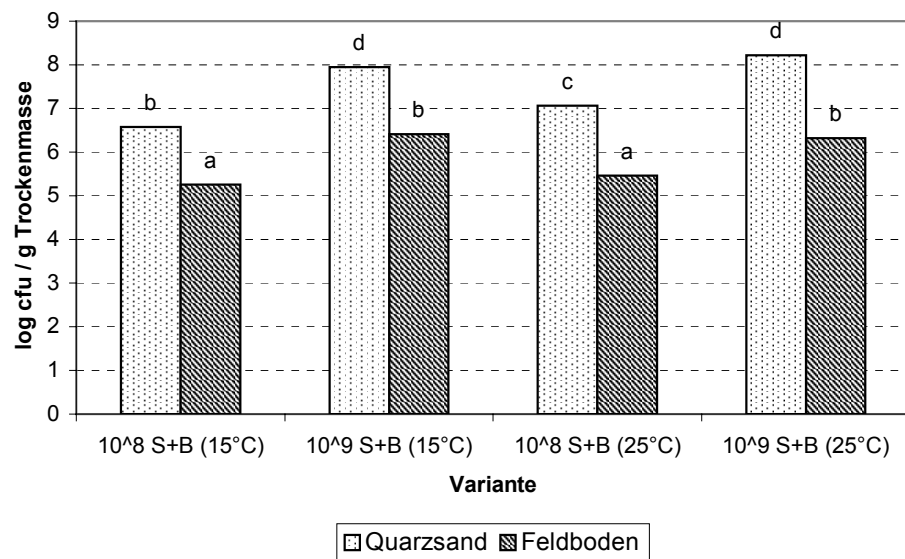


Abb.17: Vergleich der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* FZB27 in Quarzsand und in Feldboden bei zwei Temperaturstufen und unterschiedlicher introduzierter Keimzahl
 S = Saatgutbehandlung
 S+B = Saatgut- und Boden-(Substrat-)behandlung

4.3.2 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das Pflanzenwachstum

Im Gegensatz zu den in Quarzsand durchgeführten Versuchen wirkte sich die Inokulation mit *Phoma pinodella* nicht derart stark auf das Wachstum der Erbsenpflanzen aus. Bei 15 °C (Tab.21) und 25 °C (Tab.23) zeigten die Wachstumsparameter bei der inokulierten Kontrolle etwas niedrigere Werte als bei der unbehandelten Kontrolle. Bei 20 °C (Tab.22) bestand kaum ein Unterschied, teilweise wurden die höheren Werte sogar bei der mit dem Pathogen inokulierten Kontrolle ermittelt. Die Behandlungen mit *Bacillus subtilis* mit oder ohne zusätzliche Inokulation mit *Phoma pinodella* führten nicht zu signifikanten Unterschieden im Wachstum der Erbsenpflanzen gegenüber der unbehandelten und der inokulierten Kontrolle. Ausnahme: Durch die Applikation von FZB47 in einer Konzentration von 10^9 cfu / ml (kombinierte Anwendung, mit Pathogen) und FZB27 in einer Konzentration von 10^8 cfu / ml (kombinierte Anwendung, mit Pathogen) wurde bei 20 °C eine statistisch gesicherte Erhöhung der Wurzelfrischmasse gegenüber der unbehandelten Kontrolle erreicht.

Die zusammenfassende Tabelle 24 zeigt größere Sprossfrischmassen und Sprosslängen in allen Varianten im Vergleich zur mit *Phoma pinodella* inokulierten Kontrolle. Bei der Wurzelfrischmasse wurden mit zwei Ausnahmen (unbehandelte Kontrolle sowie FZB47 10^8 cfu / ml Saatgutbehandlung) ebenso höhere Werte im Vergleich zur inokulierten Kontrolle ermittelt. Bei Betrachtung der Sprossfrischmasse zeigte sich nur eine Variante (FZB27 10^9 cfu / ml + Pathogen) der unbehandelten Kontrolle überlegen. Die Erhöhung von Sprossfrischmasse und Sprosslänge durch die *Bacillus subtilis*-Applikationen gegenüber der inokulierten Kontrolle bewegte sich bei den meisten Varianten unterhalb 10 %. Im Gegensatz zu den Versuchen in Quarzsand kam es in dieser Versuchsserie durch die Behandlungen mit dem Nutzbakterium bis auf eine Ausnahme (FZB47 10^8 cfu / ml Saatgutbehandlung) auch zu einer Erhöhung der Wurzelfrischmassen von bis zu 22,1 % (FZB27 10^9 cfu / ml Saatgut- und Substratbehandlung) gegenüber der inokulierten Kontrolle.

Tab.21: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen in Feldboden ohne und mit Inokulation durch *Phoma pinodella* bei 15 °C

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	0,72	0,35	6,8	0,0712	0,0318
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	0,61	0,37	6,4	0,0612	0,0456
FZB47 10 ⁸ S	0,77	0,38	7,3	0,0761	0,0350
FZB47 10 ⁸ S / P	0,81	0,49	7,7	0,0760	0,0354
FZB47 10 ⁸ S+B	0,65	0,32	6,5	0,0646	0,0261
FZB47 10 ⁸ S+B / P	0,78	0,38	7,4	0,0811	0,0332
FZB47 10 ⁹ S	0,72	0,34	7,0	0,0715	0,0273
FZB47 10 ⁹ S / P	0,85	0,49	7,8	0,0803	0,0344
FZB47 10 ⁹ S+B	0,70	0,35	7,0	0,0741	0,0307
FZB47 10 ⁹ S+B / P	0,59	0,30	6,8	0,0595	0,0260
FZB27 10 ⁸ S+B	0,75	0,32	7,2	0,0801	0,0279
FZB27 10 ⁸ S+B / P	0,71	0,35	7,1	0,0746	0,0265
FZB27 10 ⁹ S+B	0,72	0,36	6,7	0,0734	0,0308
FZB27 10 ⁹ S+B / P	0,92	0,46	8,2	0,0887	0,0348
GD (HSD) 0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.22: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen in Feldboden ohne und mit Inokulation durch *Phoma pinodella* bei 20 °C

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	1,03	0,37	10,3	0,1001	0,0420
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	1,04	0,42	10,9	0,0962	0,0425
FZB47 10 ⁸ S	1,08	0,42	10,5	0,0951	0,0609
FZB47 10 ⁸ S / P	1,06	0,49	10,8	0,0900	0,0540
FZB47 10 ⁸ S+B	1,37	0,75	12,9	0,1234	0,0814
FZB47 10 ⁸ S+B / P	0,98	0,43	10,8	0,0951	0,0603
FZB47 10 ⁹ S	1,09	0,50	11,4	0,1006	0,0633
FZB47 10 ⁹ S / P	1,06	0,41	11,6	0,1099	0,0547
FZB47 10 ⁹ S+B	1,16	0,54	12,8	0,1126	0,0624
FZB47 10 ⁹ S+B / P	1,16	0,68	11,7	0,1045	0,0794
FZB27 10 ⁸ S+B	1,08	0,61	11,4	0,1008	0,0761
FZB27 10 ⁸ S+B / P	1,15	0,69	11,6	0,1063	0,0761
FZB27 10 ⁹ S+B	0,96	0,55	10,7	0,0898	0,0670
FZB27 10 ⁹ S+B / P	1,07	0,48	11,2	0,1076	0,0565
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	0,30	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tab.23: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen in Feldboden ohne und mit Inokulation durch *Phoma pinodella* bei 25 °C

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	1,25	0,42	10,6	0,1459	0,0389
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	1,04	0,36	10,3	0,1114	0,0293
FZB47 10 ⁸ S	1,01	0,31	9,8	0,1086	0,0259
FZB47 10 ⁸ S / P	1,04	0,38	10,8	0,1000	0,0339
FZB47 10 ⁸ S+B	1,12	0,33	10,2	0,1114	0,0301
FZB47 10 ⁸ S+B / P	1,14	0,36	10,8	0,1080	0,0303
FZB47 10 ⁹ S	1,17	0,40	10,6	0,1142	0,0328
FZB47 10 ⁹ S / P	1,04	0,41	10,8	0,1172	0,0336
FZB47 10 ⁹ S+B	1,14	0,42	10,8	0,1051	0,0386
FZB47 10 ⁹ S+B / P	1,15	0,39	10,8	0,1162	0,0332
FZB27 10 ⁸ S+B	1,00	0,36	10,4	0,0797	0,0305
FZB27 10 ⁸ S+B / P	1,07	0,35	10,4	0,1153	0,0443
FZB27 10 ⁹ S+B	1,19	0,42	11,2	0,1315	0,0373
FZB27 10 ⁹ S+B / P	1,10	0,36	10,5	0,1203	0,0316
GD (HSD) 0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab.24: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen in Feldboden ohne und mit Inokulation durch *Phoma pinodella* [% zur inokulierten Kontrolle]

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse

S = Saatgutbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	FM Spross	FM Wurzel	Spross- länge	TM Spross	TM Wurzel
Kontrolle (unbehandelt)	114,0	97,3	100,3	107,4	100,4
Kontrolle (<i>P. pinodella</i>)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
FZB47 10 ⁸ S	106,3	89,2	100,6	96,1	94,6
FZB47 10 ⁸ S / P	103,6	110,3	107,0	91,9	100,0
FZB47 10 ⁸ S+B	109,5	118,4	106,5	102,0	93,5
FZB47 10 ⁸ S+B / P	106,0	100,9	106,1	98,1	108,6
FZB47 10 ⁹ S	105,0	106,4	103,9	97,8	97,8
FZB47 10 ⁹ S / P	110,1	109,9	111,4	105,5	103,7
FZB47 10 ⁹ S+B	107,6	112,9	111,5	100,4	107,3
FZB47 10 ⁹ S+B / P	101,5	118,7	105,6	94,7	115,4
FZB27 10 ⁸ S+B	104,1	107,7	104,8	91,5	102,8
FZB27 10 ⁸ S+B / P	105,1	115,6	105,7	101,4	112,9
FZB27 10 ⁹ S+B	105,5	122,1	107,0	99,7	117,1
FZB27 10 ⁹ S+B / P	115,8	114,0	110,4	109,1	122,9

4.3.3 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen

Bei Betrachtung des Krankheitsindex der Testpflanzen ist festzustellen, dass der in der unbehandelten Kontrolle aufgetretene spontane Krankheitsbefall weitaus höher lag als bei den Versuchen in Quarzsand. Das trifft insbesondere bei Versuchstemperaturen von 20 °C und 25 °C zu. In der inokulierten Kontrolle war der Krankheitsbefall im Wurzel- und Hypokotylbereich der Erbsenpflanzen grundsätzlich höher als in der unbehandelten Kontrolle, jedoch ließ sich dieser Unterschied nur bei einer Temperatur von 15 °C

statistisch sichern. Mit zwei Ausnahmen bei 20 °C und einer Ausnahme bei 25 °C wiesen die Pflanzen in den mit *Bacillus subtilis* behandelten Varianten einen geringeren Krankheitsbefall auf als jene in der inokulierten Kontrolle. Das traf auch auf diejenigen Varianten zu, die außer mit der Bakteriensuspension auch mit *Phoma pinodella* behandelt worden waren. Vor allem bei Temperaturen von 15 °C und 20 °C war die Verbesserung der Pflanzengesundheit durch Applikation von *Bacillus subtilis* gegenüber der mit dem Pathogen inokulierten Kontrolle bei vielen Varianten statistisch abzusichern (Tab.25).

Tab.25: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf den Krankheitsbefall von Erbsenpflanzen in Feldboden ohne und mit Inokulation durch *Phoma pinodella* [Krankheitsindex in %, Spalte Gesamt: Krankheitsbefall in % zur inokulierten Kontrolle]
Signifikante Unterschiede gegenüber der inokulierten Kontrolle sind bei den drei Temperaturstufen mit „*“ gekennzeichnet (nach Kruskal-Wallis-H-Test).
P = mit Pathogen-Inokulation

Variante	15 °C	20 °C	25 °C	Gesamt
Kontrolle (unbehandelt)	15,6 *	35,8	37,5	63,2
inokulierte Kontrolle (P. pinodella)	53,4	38,5	48,9	100,0
FZB47 10 ⁸ S	18,3 *	39,6	34,2 *	65,3
FZB47 10 ⁸ S / P	34,2	27,3	34,8 *	68,4
FZB47 10 ⁸ S+B	20,3 *	31,7	30,2 *	58,3
FZB47 10 ⁸ S+B / P	33,3 *	37,3	33,8 *	74,1
FZB47 10 ⁹ S	19,6 *	26,7	24,3 *	50,1
FZB47 10 ⁹ S / P	33,8 *	40,4	40,8	81,6
FZB47 10 ⁹ S+B	20,8 *	11,0 *	28,6+ *	42,5
FZB47 10 ⁹ S+B / P	32,5 *	20,7 *	44,8	69,5
FZB27 10 ⁸ S+B	21,0 *	10,5 *	33,5 *	46,2
FZB27 10 ⁸ S+B / P	35,3	32,0	58,5	89,3
FZB27 10 ⁹ S+B	34,8	12,2 *	32,1 *	56,2
FZB27 10 ⁹ S+B / P	20,7 *	27,5	32,7 *	57,4

Die Relativwerte im Mittel aller drei Versuche wiesen eine klare Senkung des Krankheitsindex durch Einsatz des Nutzbakteriums aus. Dieser lag bei den mit *Bacillus subtilis* behandelten Pflanzen um bis zu 57,5 % (FZB47 10^9 cfu / ml, Saatgut- und Substratbehandlung) unter dem der inokulierten Kontrolle. Das bedeutet, es konnte im Feldboden ein wesentlich besserer Effekt gegen den Krankheitserreger erzielt werden als in Quarzsand.

4.4 Langzeitversuch

4.4.1 Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis*

Bei dem über 60 Tage gelaufenen Langzeitversuch wurden die Erbsensamen mit einer Sporensuspension der *Bacillus subtilis*-Isolate FZB47 und FZB27 in einer Konzentration von 10^8 cfu / ml behandelt. Abb.18 zeigt, dass die Anzahl der an den Erbsensamen wiedergefundenen *Bacillus subtilis*-Keime etwas mehr als zwei Zehnerpotenzen unter dem angewandten Titer lag. Dabei wiesen die mit FZB27 behandelten Samen geringfügig höhere Keimzahlen auf als die mit FZB47 behandelten. Diese Differenz war jedoch nicht signifikant.

Die sich aus diesen Ausgangswerten ergebenden Populationsdichten von *Bacillus subtilis* im Substrat (Feldboden) nach 60 Tagen Versuchsdauer sind in Abb.19 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die Besiedlungsdichte des Nutzbakteriums in Feldboden bei alleiniger Saatgutbehandlung signifikant geringer war als bei Substratbehandlung und kombinierter Anwendung. Dabei war die Keimzahl von *Bacillus subtilis* bei Saatgut- und Substratbehandlung nur unwesentlich und nicht signifikant höher als bei alleiniger Substratbehandlung. Die Populationsdichte von FZB27 (kombinierte Anwendung) war etwas niedriger als von FZB47 (kombinierte Anwendung). Dieser Unterschied war statistisch abzusichern.

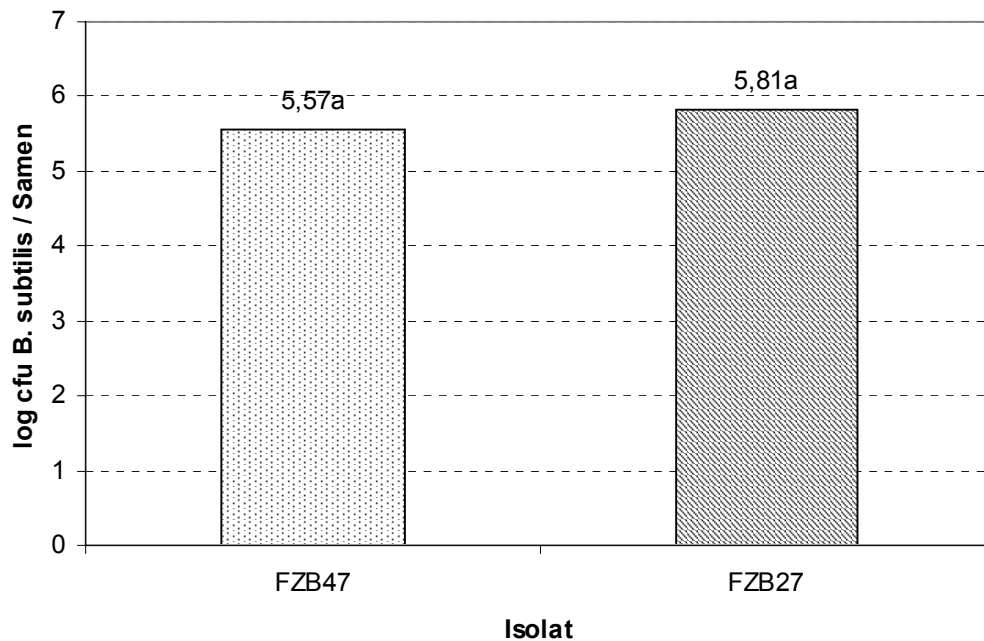


Abb.18: Mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche von behandeltem Erbsensaatgut beim Langzeitversuch
angewandter Titer: 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Der in Abb.20 dargestellte Vergleich der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* in Feldboden nach 30 Tagen (Werte aus Versuchsserie 3) und nach 60 Tagen zeigt, dass sich bei FZB47 die Werte nach 30 und nach 60 Tagen kaum unterschieden. Sowohl bei alleiniger Saatgutbehandlung als auch bei kombinierter Saatgut- und Substratbehandlung waren keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Populationsdichte der Bakterien zu den genannten beiden Ermittlungszeitpunkten festzustellen. Im Gegensatz dazu lag die Keimzahl von *Bacillus subtilis* FZB27 (kombinierte Anwendung) in Feldboden nach 60 Tagen signifikant unter dem nach 30 Tagen ermittelten Wert. Nach 30 Tagen war die Keimzahl von FZB27 (kombinierte Anwendung) signifikant höher als von FZB47 (kombinierte Anwendung), nach 60 Tagen fiel der Wert auf das Niveau von FZB47 bei gleicher Art der Anwendung und gleichem applizierten Titer zurück.

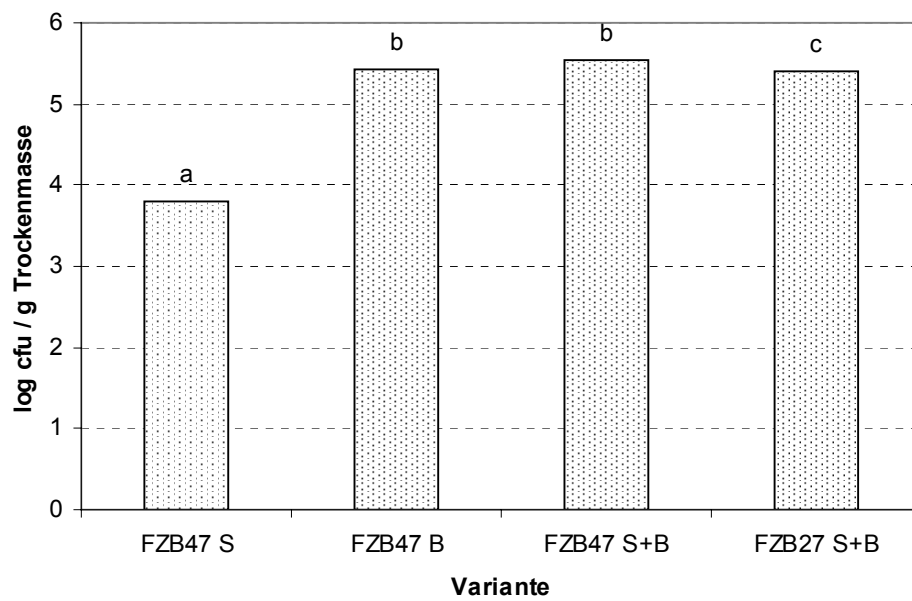


Abb.19: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in Feldboden nach 60 Tagen

S = Saatgutbehandlung, B = Substratbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

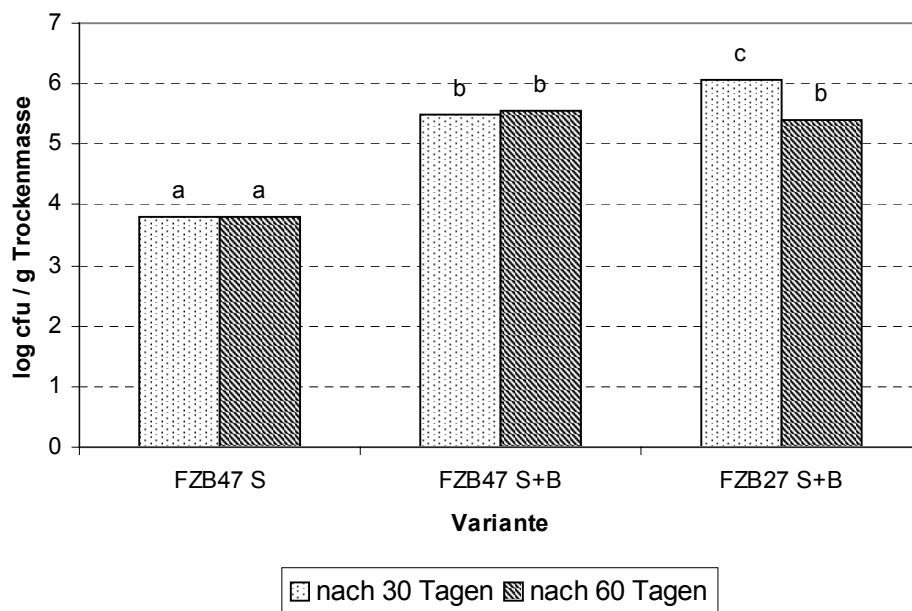


Abb.20: Vergleich der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in Feldboden nach 30 und nach 60 Tagen

S = Saatgutbehandlung

S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

4.4.2 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das Pflanzenwachstum

Der Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das Wachstum der Erbsenpflanzen beim Langzeitversuch ist in Tab.26 dargestellt. Ähnlich wie nach 30 Tagen Versuchsdauer waren auch nach 60 Tagen trotz der größeren Anzahl an Wiederholungen bei den einzelnen Wachstumsparametern kaum signifikante Unterschiede zwischen den Varianten festzustellen. Lediglich durch die alleinige Substratbehandlung mit FZB47 wurde bei Wurzelfrischmasse und Sprosslänge eine Überlegenheit gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen.

Tab.26: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen in Feldboden bei 20 °C nach 60 Tagen Versuchsdauer
FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse
S = Saatgutbehandlung, B = Substratbehandlung, S+B = Saatgut- und Substratbehandlung

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	FM Früchte [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle	1,49	0,29	0,54	14,1	0,2418	0,0277
FZB47 10 ⁸ S	1,31	0,33	0,45	14,5	0,1882	0,0290
FZB47 10 ⁸ B	1,53	0,41	0,50	15,5	0,2431	0,0352
FZB47 10 ⁸ S+B	1,37	0,33	0,46	13,8	0,2278	0,0337
FZB27 10 ⁸ S+B	1,26	0,34	0,43	14,0	0,1942	0,0335
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	0,09	<i>n.s.</i>	1,3	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
<i>relative Werte [% zur Kontrolle]</i>						
Kontrolle	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
FZB47 10 ⁸ S	88,1	112,8	83,5	102,5	77,8	104,7
FZB47 10 ⁸ B	102,7	140,8	92,0	110,0	100,5	127,1
FZB47 10 ⁸ S+B	92,3	113,4	85,5	97,8	94,2	121,7
FZB27 10 ⁸ S+B	84,9	117,4	79,8	99,3	80,3	120,9

Bei Betrachtung der relativen Werte in Tab.26 wird deutlich, dass sich der Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen in erster Linie in einem kräftigeren Wurzelsystem der Testpflanzen äußerte. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle kam es durch Applikation von FZB47 (Substratbehandlung) zu einer mehr als 40 %igen Erhöhung der Wurzelfrischmasse. Bei Frisch- und Trockenmasse des Sprosses sowie der Sprosslänge wurde dagegen in vielen Fällen eine leichte Verminderung des Wachstums durch die Behandlungen mit Bakteriensuspensionen ermittelt. Auch die Fruchtentwicklung war bei allen *Bacillus subtilis*-Varianten nach 60 Tagen noch nicht so weit fortgeschritten wie bei der unbehandelten Kontrolle.

4.4.3 Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen

Tab.27: Einfluss verschiedener *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf den Krankheitsindex von Erbsenpflanzen in Feldboden ohne Inokulation mit *Phoma pinodella* nach 60 Tagen bei 20 °C
Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle sind mit „*“ gekennzeichnet (nach Kruskal-Wallis-H-Test).

Variante	Krankheitsindex [%]	% zur Kontrolle
Kontrolle	44,0	100,0
FZB47 10 ⁸ S	47,0	106,8
FZB47 10 ⁸ B	34,9	79,3
FZB47 10 ⁸ S+B	33,7	76,6
FZB27 10 ⁸ S+B	51,5	117,1

Beim Langzeitversuch wurde keine Inokulation mit einem phytopathogenen Pilz vorgenommen – es handelt sich bei dem in Tab.27 in Form des Krankheitsindex dargestellten Krankheitsbefalls der Erbsenpflanzen also ausschließlich um spontanen Befall mit bodenbürtigen Krankheitserregern. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache lag der Krankheitsindex in der unbehandelten Kontrolle mit 44 % recht hoch. Durch die Applikation von *Bacillus subtilis* wurde keine signifikante Beeinflussung des Krankheitsbefalls festgestellt. Der Wert für den Krankheitsindex lag um bis zu 17,1 %

über (FZB27, kombinierte Anwendung) bzw. 23,4 % unter (FZB47, kombinierte Anwendung) dem der unbehandelten Kontrolle.

4.5 Einzelversuche zur Untersuchung von Populations- und Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis*

4.5.1 Populationsdynamik

Die Behandlung mit einer *Bacillus subtilis*-Sporensuspension der Konzentration 10^8 cfu / ml resultierte in Keimzahlen von log cfu 6,39 bis 6,46 an den Erbsensamen. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchen in Quarzsand und Feldboden sowie zwischen den Isolaten FZB47 und FZB27 festgestellt (Abb.21).

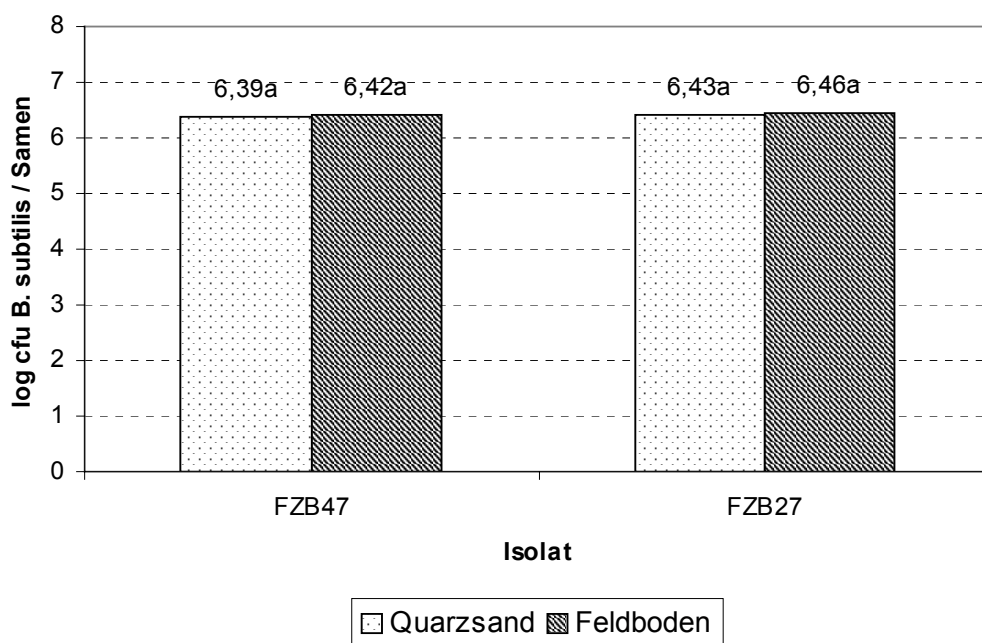
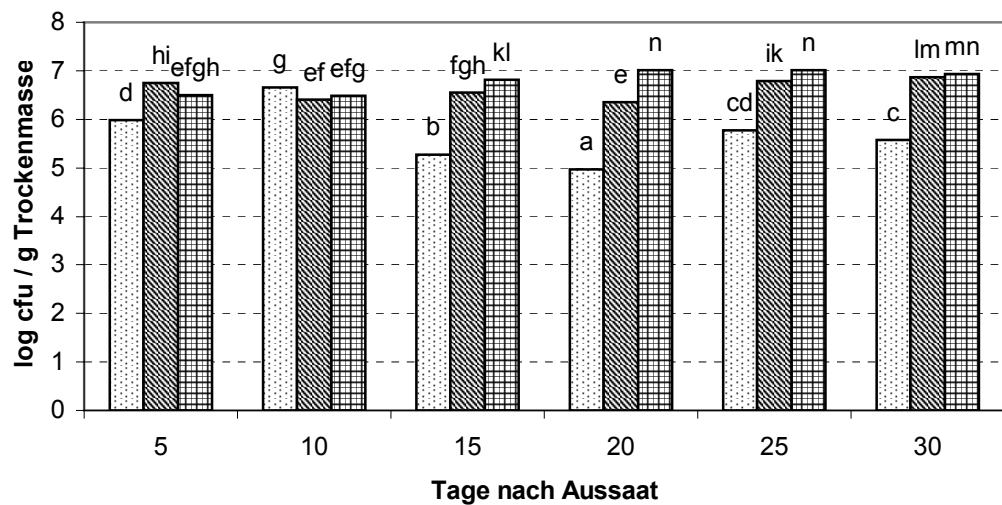


Abb.21: Mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche von behandeltem Erbsensaatgut bei den Einzelversuchen zur Populations- und Aktivitätsdynamik
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml



Saatgutbehandlung
 Substratbehandlung
 Saatgut- und Substratbeh.

Abb.22: Entwicklung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 in der Rhizosphäre von Erbsenpflanzen in Quarzsand
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Wie Abb.22 zeigt, wurden beim Vergleich von alleiniger Saatgutbehandlung und kombinierter Anwendung im Rhizosphärenbereich (Quarzsand) deutliche Unterschiede sichtbar. Mit Ausnahme der ersten beiden Probenahmetermine wurden die höchsten Werte bei Saatgut- und Substratapplikation ermittelt. Bei alleiniger Saatgutbehandlung bewegte sich die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* im Rhizosphärenbereich außer am 2. Probenahmetermin (nach 10 Tagen) zwischen 10^5 und 10^6 cfu / g Wurzeltrockenmasse. Zwar stieg zu den letzten beiden Probenahmezeitpunkten die Keimzahl des Nutzbakteriums gegenüber den vorherigen beiden Terminen signifikant an, jedoch war insgesamt hinsichtlich der Populationsentwicklung ein eher negativer Trend zu verzeichnen. Ein etwas anderes Besiedlungsverhalten war bei kombinierter Anwendung festzustellen. Die Populationsdichte des untersuchten Bakteriums, die im Versuchszeitraum zwischen 10^6 und 10^7 cfu / g Wurzeltrockenmasse lag, war gegen Versuchsende geringfügig höher als zu den ersten beiden Probenahmeterminen. FZB27 Saatgut- und Substratbehandlung zeigte ein ähnliches Verhalten wie FZB47 Saatgut- und Substratbehandlung, weshalb auf deren Darstellung verzichtet wurde. Bei alleiniger Substratbehandlung mit FZB47 lag die Besiedlungsdichte in der Rhizosphäre zu

Versuchsbeginn geringfügig höher als bei kombinierter Anwendung, nahm dann bis etwa 20 Tage nach der Aussaat ab, um zum Versuchsende hin wiederum anzusteigen.

Im Feldboden lag die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre bei kombinierter Anwendung in der gleichen Größenordnung wie in Quarzsand. Demgegenüber wurden bei einfacher Saatgutbehandlung niedrigere Werte ermittelt als in Quarzsand. Wie in diesem, so zeigte sich auch hier tendenziell eine leichte Abnahme der Keimzahl des Nutzbakteriums im Laufe des Versuches. Bei Saatgut- und Substratapplikation stieg die Populationsdichte zunächst an und erreichte am 10. und 15. Tag ihr Maximum, fiel danach jedoch wieder ab. Bei alleiniger Substratbehandlung war ein signifikanter Anstieg der Besiedlungsdichte zum Versuchsende hin zu verzeichnen (Abb.23).

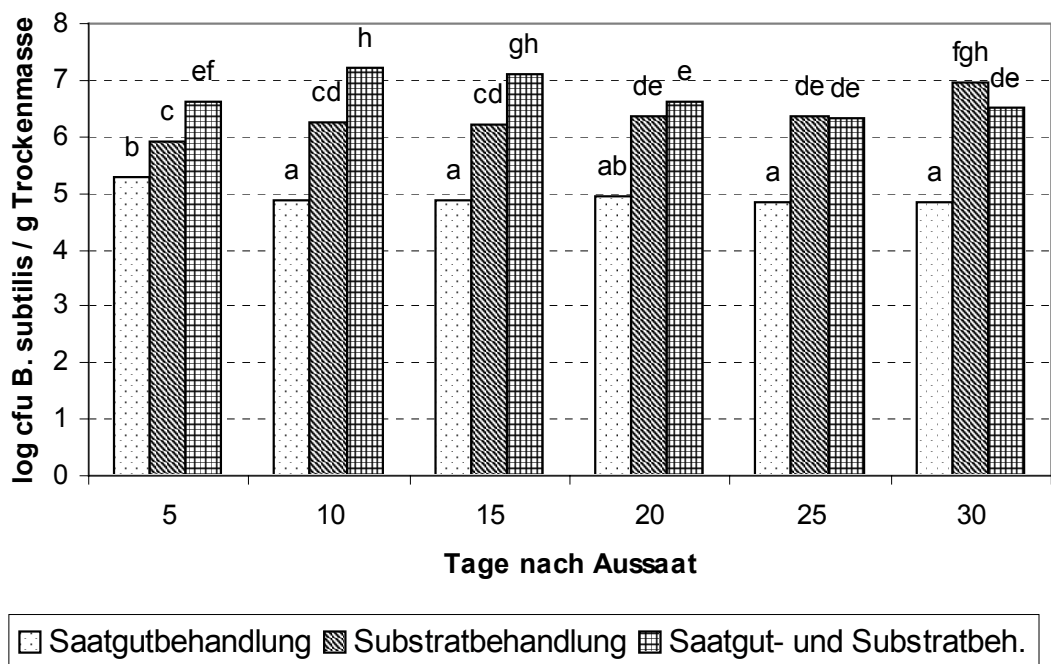


Abb.23: Entwicklung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 in der Rhizosphäre von Erbsenpflanzen in Feldboden
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Bei Betrachtung der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* im Bereich der Rhizoplane war zu ersehen, dass diese bei dem in Quarzsand durchgeführten Versuch geringfügig höher lag als in der Rhizosphäre (Tab.28). Zudem war bei den meisten Varianten ein leichter Anstieg der Keimzahl des introduzierten Bakteriums zu beobachten. Während sich die Populationsdichte zwischen den Varianten mit Saatgut- und

Substratbehandlung bzw. einfacher Substratbehandlung kaum unterschied, lagen die Werte bei alleiniger Saatgutbehandlung sehr deutlich unter denen der anderen Varianten. Das traf auch für den Versuch in Feldboden zu. Hier allerdings bewegten sich die Keimzahlen von *Bacillus subtilis* im Bereich der Rhizoplane geringfügig unter denen in der Rhizosphäre, außer bei alleiniger Saatgutbehandlung. Die Besiedlungsdichte schwankte im Lauf des Versuches zwar etwas, eine Tendenz in die eine oder andere Richtung abzulesen erschien jedoch schwierig.

Tab.28: Entwicklung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizoplane von Erbsenpflanzen bei 30 Tagen Versuchsdauer [log cfu / g Trockenmasse]
n.e. = nicht ermittelt

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
FZB47 10 ⁸ S	5,57 a	6,52 b	8,12 k	6,84 c	7,04 cd	7,06 cd
FZB47 10 ⁸ B	6,87 c	6,93 c	7,21 de	7,23 defg	7,45 efghi	7,43 efghi
FZB47 10 ⁸ S+B	6,93 c	7,24 defg	7,48 ghi	7,51 hi	7,45 efghi	7,56 i
FZB27 10 ⁸ S+B	7,22 def	7,27 defg	7,34 efghi	7,47 fghi	7,43 efghi	7,53 i
<i>Feldboden</i>						
FZB47 10 ⁸ S	n.e.	5,04 a	5,10 a	5,12 a	5,20 a	5,08 a
FZB47 10 ⁸ B	n.e.	6,11 cd	5,97 cd	5,45 ab	5,96 cd	5,81 bc
FZB47 10 ⁸ S+B	n.e.	5,79 bc	5,45 ab	6,01 cd	6,07 cd	6,00 cd
FZB27 10 ⁸ S+B	n.e.	5,90 c	6,09 cd	5,92 cd	6,09 cd	6,34 d

Im Substrat wurden bei alleiniger Saatgutbehandlung deutlich niedrigere Keimzahlen von *Bacillus subtilis* ermittelt als bei den Varianten, bei denen auch eine Substratapplikation erfolgte. Dies trat in Feldboden besonders auffällig zutage. In Quarzsand stieg in der Variante mit alleiniger Saatgutbehandlung die Besiedlungsdichte im Versuchsverlauf jedoch um mehr als eine Zehnerpotenz an. Ansonsten blieben die Keimzahlen im Substrat während der Versuchsdauer weitgehend konstant; im Feldboden war ein leichter Rückgang der Populationsdichte zum Versuchsende hin zu verzeichnen. Bei dem in Quarzsand durchgeführten Versuch war das Substrat weniger

stark mit dem introduzierten Bakterium besiedelt als Rhizosphäre und Rhizoplane. Das war im Feldboden nicht der Fall. Tab.29 zeigt, dass die im Feldboden ermittelten Keimzahlen zumeist über denen im Quarzsand lagen.

Tab.29: Entwicklung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Substrat bei 30 Tagen Versuchsdauer [log cfu / g Trockenmasse]
n.e. = nicht ermittelt

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
FZB47 10 ⁸ S	2,95 a	2,82 a	3,50 b	4,97 d	4,18 c	4,03 c
FZB47 10 ⁸ B	5,54 ef	5,43 ef	5,51 ef	6,35 i	5,43 ef	5,67 fg
FZB47 10 ⁸ S+B	5,49 ef	5,57 ef	5,48 ef	7,01 k	5,43 ef	5,85 gh
FZB27 10 ⁸ S+B	5,85 gh	5,44 ef	5,46 ef	6,78 k	5,37 e	5,98 h
<i>Feldboden</i>						
FZB47 10 ⁸ S	3,13 ab	3,14 ab	3,26 b	3,60 c	3,12 ab	2,97 a
FZB47 10 ⁸ B	n.e.	6,15 hik	6,09 ghik	6,02 fg hi	5,98 fg hi	5,58 de
FZB47 10 ⁸ S+B	n.e.	6,25 ik	5,95 fgh	5,85 fg	5,54 d	5,90 fgh
FZB27 10 ⁸ S+B	n.e.	6,23 ik	6,31 k	5,83 efg	5,76 def	5,94 fgh

Die in Tab.30 dargestellten Gesamtkeimzahlen an der Wurzelspitze der Erbsenpflanzen bewegten sich in Quarzsand während der 30 Tage Versuchsdauer zwischen 10⁶ und 10¹⁰ cfu / g Wurzeltrockenmasse. Dabei war bei der unbehandelten Kontrolle und bei alleiniger Saatgutbehandlung nach 5 Tagen ein signifikant niedrigerer Wert festzustellen als bei den übrigen Varianten. Außer bei FZB47, Saatgut- und Substratbehandlung, war vom 5. bis zum 15. Tag ein signifikanter Anstieg der Gesamtkeimzahl an der Wurzelspitze zu beobachten. Im Zeitraum vom 15. bis zum 30. Tag nach der Aussaat war kein eindeutiger Trend mehr feststellbar, die Gesamtkeimzahlen lagen bei allen Varianten zwischen 10⁸ und 10¹⁰ cfu / g Wurzeltrockenmasse. Ein statistisch abzusichernder Anstieg der Gesamtkeimzahl an der Wurzelspitze bei allen Varianten vom 5. bis zum 15. Tag nach der Aussaat wurde auch in Feldboden deutlich, ebenso die recht geringfügige Veränderung der Gesamtkeimzahl

vom 15. bis zum 30. Tag nach der Aussaat. Eine signifikant niedrigere Keimzahl nach 5 Tagen bei der Kontrolle und alleiniger Saatgutbehandlung war hier allerdings nicht zu beobachten. Im Feldboden lagen die Gesamtkeimzahlen an der Wurzelspitze während des Versuchszeitraumes im Bereich zwischen 10^8 und 10^{11} cfu / g Wurzeltrockenmasse und damit im Durchschnitt höher als in Quarzsand.

Tab.30: Entwicklung der Gesamtkeimzahl an der Wurzelspitze von Erbsenpflanzen im Verlauf von 30 Tagen Versuchsdauer [log cfu / g Trockenmasse]

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
Kontrolle	6,86 a	8,20 c	8,71 def	9,31 hik	9,28 ghik	9,01 fg
FZB47 10^8 S	6,99 a	8,23 c	8,95 efg	8,75 def	9,66 lm	8,78 def
FZB47 10^8 B	8,48 cd	8,20 c	9,27 ghik	9,68 lm	9,41 ik	9,17 gh
FZB47 10^8 S+B	9,75 m	7,73 b	9,22 ghi	9,51 kl	9,21 gh	8,97 efg
FZB27 10^8 S+B	7,77 b	8,62 d	9,04 fg	9,51 kl	8,64 de	9,41 ik
<i>Feldboden</i>						
Kontrolle	9,26 b	9,87 defg	10,31 i	10,14 fghi	10,00 efghi	10,19 ghi
FZB47 10^8 S	9,26 b	9,84 def	9,62 cd	9,83 def	9,82 def	9,95 efgh
FZB47 10^8 B	9,32 bc	9,82 def	10,19 ghi	10,37 i	10,20 ghi	9,96 efgh
FZB47 10^8 S+B	9,13 a	9,91 defg	10,07 efghi	10,26 hi	9,91 defg	9,82 def
FZB27 10^8 S+B	8,84 a	9,77 de	9,83 def	9,90 defg	9,88 defg	10,09 efghi

Die Gesamtkeimzahlen im Substrat (Tab.31) waren sowohl in Quarzsand als auch in Feldboden über den gesamten Versuchszeitraum deutlich geringer als an der Wurzelspitze. In Quarzsand war außer bei FZB47 Substratbehandlung sowie FZB47 Saatgut- und Substratbehandlung ein leichter Aufwärtstrend im Laufe des Versuches erkennbar. In Feldboden lagen die Gesamtkeimzahlen durchschnittlich um eine Zehnerpotenz höher als in Quarzsand, zum Anfang des Versuches war diese Differenz noch größer. Im Gegensatz zu Quarzsand war die Gesamtkeimzahl in Feldboden nach 30 Tagen Versuchsdauer bei allen Varianten signifikant geringer als nach 5 Tagen.

Wesentliche Unterschiede zwischen der Kontrolle und den behandelten Varianten bestanden in beiden verwendeten Substraten nicht.

Tab.31: Entwicklung der Gesamtkeimzahl im Substrat im Verlauf von 30 Tagen

Versuchsdauer [log cfu / g Trockenmasse]

n.e. = nicht ermittelt

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
Kontrolle	5,70 a	6,44 bcdefg	6,88 ikl	6,87 ikl	7,18 lm	7,04 kl
FZB47 10 ⁸ S	5,75 a	6,42 bcdefg	6,65 defghi	6,43 bcdefg	7,42 m	6,65 cdefgh
FZB47 10 ⁸ B	n.e.	6,94 ikl	6,40 bedef	6,50 cdefgh	6,52 cdefgh	6,36 bcde
FZB47 10 ⁸ S+B	6,74 ghik	6,62 cdefgh	6,52 cdefgh	6,91 ikl	6,54 cdefgh	6,70 fghik
FZB27 10 ⁸ S+B	6,11 b	6,34 bcd	6,87 ikl	6,69 efghi	6,32 bc	6,82 hik
<i>Feldboden</i>						
Kontrolle	8,05 c	8,20 d	7,59 ab	7,40 ab	7,51 ab	7,54 ab
FZB47 10 ⁸ S	8,24 d	7,60 ab	7,51 ab	7,44 ab	7,56 ab	7,43 ab
FZB47 10 ⁸ B	8,19 d	8,19 d	7,60 ab	7,42 ab	7,34 a	7,56 ab
FZB47 10 ⁸ S+B	8,13 d	8,34 d	7,52 ab	7,38 a	7,59 ab	7,70 abc
FZB27 10 ⁸ S+B	8,16 d	7,75 bc	7,54 ab	7,38 a	7,46 ab	7,68 ab

4.5.2 Aktivitätsdynamik

Die Aktivität von *Bacillus subtilis*, ermittelt anhand des Versporungsgrades, zeigte im Lauf des Versuches starke Schwankungen, die keine klare Tendenz erkennen ließen (Tab.32-34).

Tab.32: Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre von Erbsenpflanzen bei 30 Tagen Versuchsdauer, gemessen am Versporungsgrad [%]

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
FZB47 10 ⁸ S	100	85	63	100	97	98
FZB47 10 ⁸ B	75	73	98	100	96	100
FZB47 10 ⁸ S+B	92	98	92	64	63	100
FZB27 10 ⁸ S+B	100	100	100	100	100	99
<i>Feldboden</i>						
FZB47 10 ⁸ S	74	100	75	100	100	100
FZB47 10 ⁸ B	83	100	97	100	100	60
FZB47 10 ⁸ S+B	96	74	60	100	68	100
FZB27 10 ⁸ S+B	75	94	81	54	91	93

Tab.33: Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis* in der Rhizoplane von Erbsenpflanzen bei 30 Tagen Versuchsdauer, gemessen am Versporungsgrad [%]; n.e. = nicht ermittelt

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
FZB47 10 ⁸ S	98	100	77	96	97	86
FZB47 10 ⁸ B	100	80	70	93	96	100
FZB47 10 ⁸ S+B	100	56	84	59	63	90
FZB27 10 ⁸ S+B	99	68	68	67	100	79
<i>Feldboden</i>						
FZB47 10 ⁸ S	n.e.	75	50	64	40	100
FZB47 10 ⁸ B	n.e.	100	71	73	100	100
FZB47 10 ⁸ S+B	n.e.	61	100	80	89	97
FZB27 10 ⁸ S+B	n.e.	76	100	57	83	88

Tab.34: Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis* im Substrat bei 30 Tagen Versuchsdauer, gemessen am Versporungsgrad [%]

Variante	Tage nach Aussaat					
	5	10	15	20	25	30
<i>Quarzsand</i>						
FZB47 10 ⁸ S	100	71	100	91	85	93
FZB47 10 ⁸ B	94	77	97	87	68	98
FZB47 10 ⁸ S+B	83	91	79	93	72	94
FZB27 10 ⁸ S+B	75	83	88	93	80	100
<i>Feldboden</i>						
FZB47 10 ⁸ S	32	100	84	49	89	89
FZB47 10 ⁸ B	n.e.	96	95	61	85	71
FZB47 10 ⁸ S+B	n.e.	61	96	61	75	70
FZB27 10 ⁸ S+B	n.e.	41	76	78	73	100

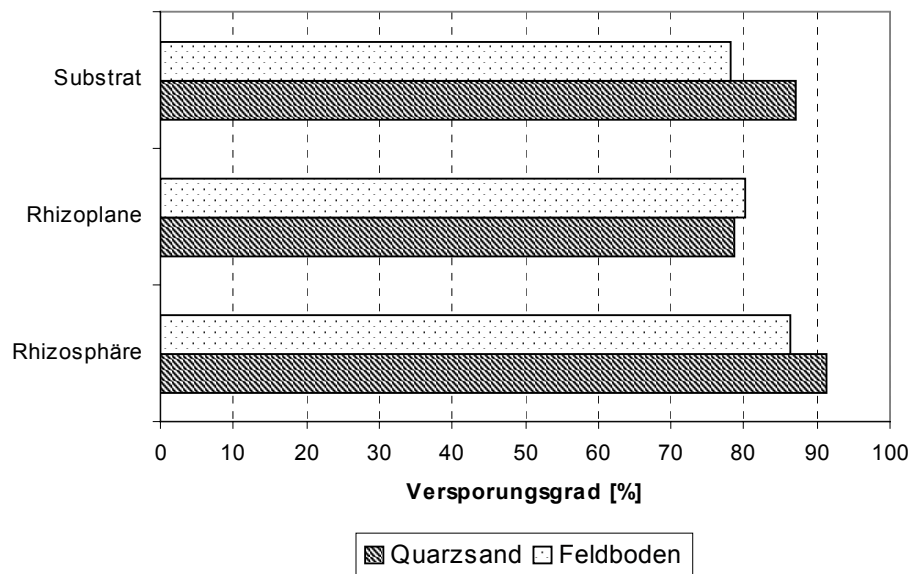


Abb.24: Mittlerer Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* an Erbsenwurzeln und im Substrat bei 20 °C

In Abb.24 sind die Versporungsgrade über alle Probenahmeterminen zusammengefasst. Im Mittel lag der Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* bei beiden Versuchen etwa zwischen 75 % und 95 %. In Quarzsand wurden im Substrat und im Rhizosphärenbereich Versporungsgrade um 90 % ermittelt. Die größte Aktivität der introduzierten Bakterien war im Bereich der Rhizoplane festzustellen. Hier lagen noch 78,7 % der Bakterienzellen verspor vor. In Feldboden wurden im Substrat und in der Rhizosphäre deutlich niedrigere Versporungsgrade als bei dem in Quarzsand durchgeführten Versuch ermittelt. Dagegen war die Aktivität im Bereich der Rhizoplane kaum unterschiedlich. Im Feldboden wurde mit 78,2 % der niedrigste Versporungsgrad und damit die höchste Aktivität im Substrat festgestellt.

4.6 Komplexversuche

4.6.1 Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis*

Die in Abb.25 dargestellte Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche des behandelten Erbsensaatgutes lag knapp drei Zehnerpotenzen unter dem behandelten Titer. Bei FZB47 in Kombination mit dem Neem-Präparat Rakshak Gold war die Bakterienkeimzahl an den Samen bei den beiden Versuchen in Aussaaterde signifikant höher als bei dem Versuch in Feldboden. Zwischen einer Behandlung mit FZB47 allein

und FZB47 in Kombination mit Rakshak Gold bestanden kaum Unterschiede, auch wenn die Anzahl der am Saatgut anhaftenden Keime der introduzierten Bakterien beim Klimakammer-Versuch in Aussaaterde bei der kombinierten Anwendung signifikant höher war als bei einfacher Applikation von FZB47 (Abb.25).

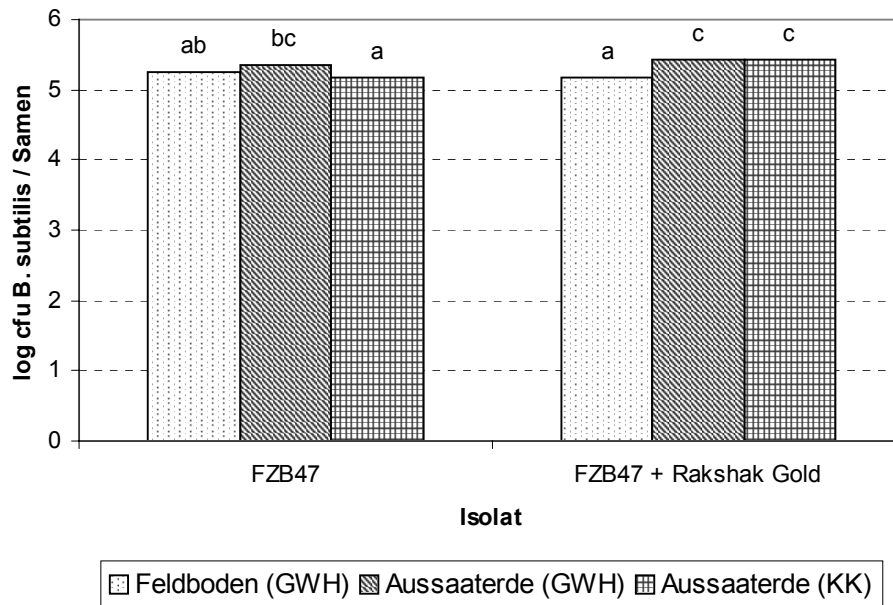


Abb.25: Mittlere Keimzahl von *Bacillus subtilis* auf der Oberfläche von behandeltem Erbsensaatgut bei den Komplexversuchen in Feldboden und Aussaaterde (GWH = Gewächshaus; KK = Klimakammer)
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

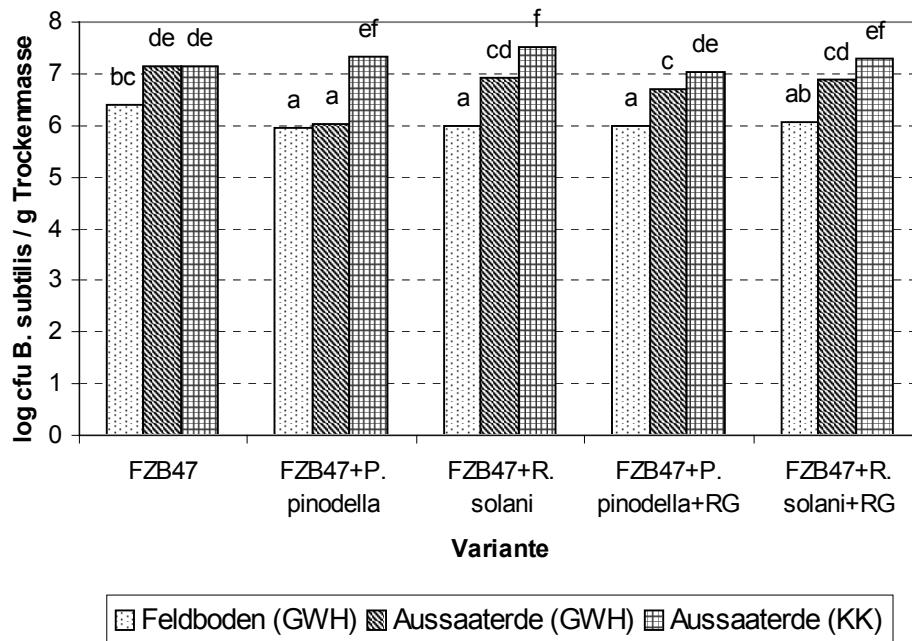


Abb.26: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen mit und ohne Pathogen-Inokulation und Neem-Zusatz (GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer, RG = Rakshak Gold)
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Bei Betrachtung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre nach 30 Tagen Versuchsdauer (Abb.26) wird deutlich, dass diese in Feldboden (Gewächshausversuch) am niedrigsten war. Bei dem Versuch in Aussaaterde (Gewächshausversuch) wurden mit einer Ausnahme (FZB47 + *Phoma pinodella*) statistisch nachweisbar höhere Besiedlungsdichten ermittelt als in Feldboden. Die höchsten Keimzahlen von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre der Erbsenpflanzen wurden durchweg beim Klimakammer-Versuch in Aussaaterde gefunden. Außer der alleinigen Anwendung von FZB47 war dieser Unterschied gegenüber den anderen beiden Versuchen statistisch abzusichern.

In Feldboden lag die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre bei allen Varianten recht konstant bei etwa 10^6 cfu / g Trockenmasse. Lediglich bei alleiniger Applikation von FZB47 wurde eine signifikant höhere Populationsdichte gegenüber allen anderen Varianten dieses Versuches ermittelt. Auch beim

Gewächshausversuch in Aussaaterde wurde die höchste Keimzahl der introduzierten Bakterien bei alleiniger Behandlung mit FZB47 festgestellt. Die Inokulation mit den phytopathogenen Pilzen, insbesondere mit *Phoma pinodella*, führte zu signifikant geringeren Populationsdichten von *Bacillus subtilis*. Kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten zeigten sich beim Klimakammer-Versuch in Aussaaterde, bei dem die Keimzahl von *Bacillus subtilis* zwischen 10^7 und 10^8 cfu / g Trockenmasse lag. Insgesamt blieb der Zusatz von Rakshak Gold bei allen drei Versuchen weitgehend ohne Einfluss auf die Populationsdichte des Nutzbakteriums. Einzige Ausnahme: Beim Gewächshausversuch in Aussaaterde wurde die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* FZB47 bei Inokulation mit *Phoma pinodella* durch den Neem-Zusatz signifikant erhöht.

Die Populationsdichte von FZB47 in der Rhizoplane (Abb.27) wurde nur für die beiden Versuche in Aussaaterde ermittelt. Die Keimzahl der Nutzbakterien bewegte sich in beiden Versuchen um 10^6 cfu / g Trockenmasse und war somit etwas niedriger als im Rhizosphärenbereich. Bei den Varianten „FZB47“ und „FZB47 + *Phoma pinodella*“ war die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* im Gewächshausversuch tendenziell erhöht gegenüber dem Versuch in der Klimakammer. Bei den anderen drei Varianten wurden die höheren Werte im Klimakammer-Versuch ermittelt.

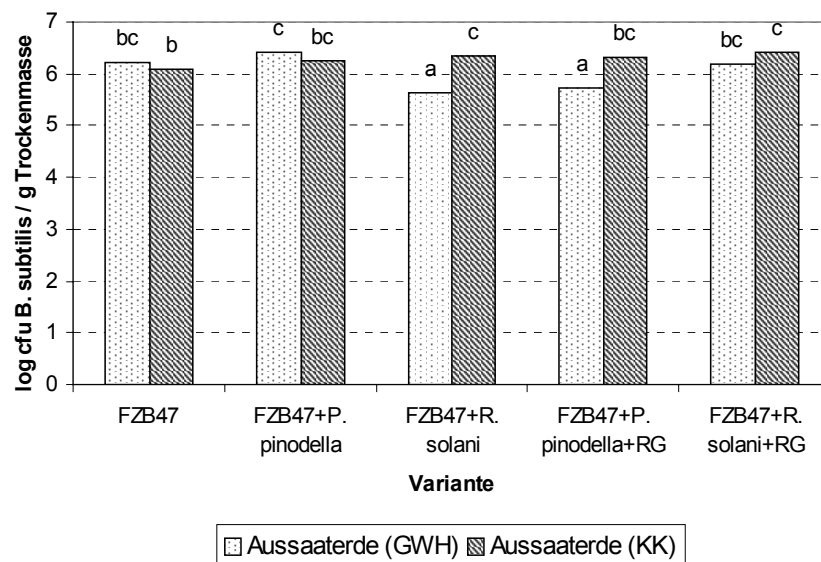


Abb.27: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizoplane von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen mit und ohne Pathogen-Inokulation und Neem-Zusatz (GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer, RG = Rakshak Gold)
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Im Substrat (Abb.28) wurden beim Gewächshausversuch in Feldboden Populationsdichten von *Bacillus subtilis* im Bereich zwischen 10^5 und 10^6 cfu / g Trockenmasse festgestellt. Die Werte waren damit etwas geringer als im Rhizosphärenbereich. Die Inokulation mit *Phoma pinodella* sowie *Rhizoctonia solani* hatten keine Reduktion der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* im Substrat zur Folge. Der Zusatz von Rakshak Gold blieb auch hier ohne Einfluss auf die Keimzahl der introduzierten Bakterien. In Aussaaterde lag die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Bereich zwischen 10^6 und 10^7 cfu / g Trockenmasse und damit grundsätzlich signifikant über den in Feldboden ermittelten Werten. Innerhalb der Varianten wurden in Aussaaterde keine statistisch abzusichernden Unterschiede zwischen dem Versuch in der Klimakammer und dem unter Gewächshausbedingungen festgestellt. Die Zugabe von Rakshak Gold sowie die Inokulation mit *Phoma pinodella* bzw. *Rhizoctonia solani* hatte ebenfalls keine signifikante Änderung der Keimzahl von *Bacillus subtilis* in Aussaaterde zur Folge.

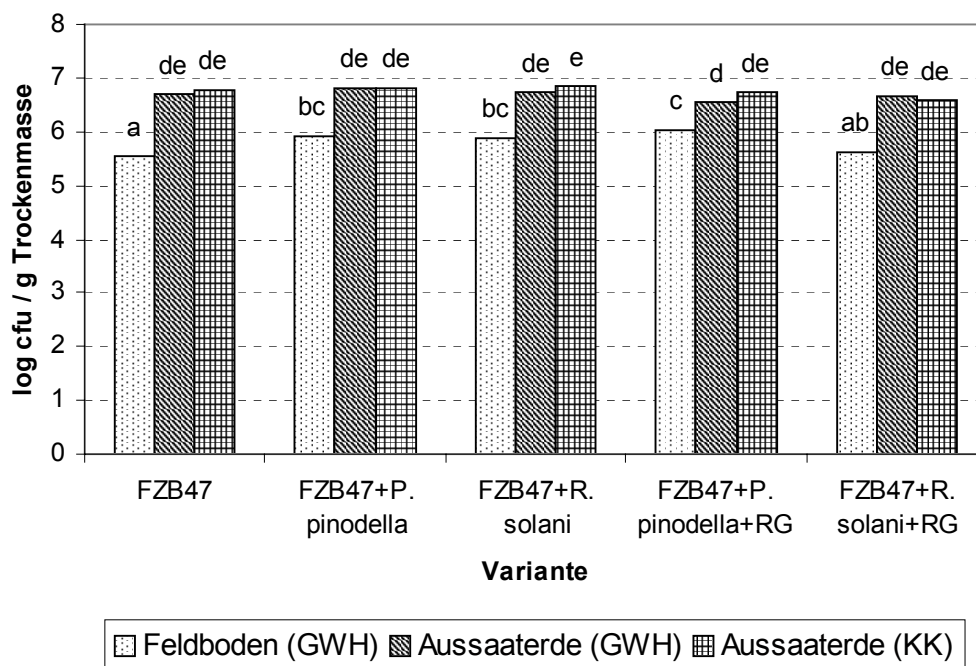


Abb.28: Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Substrat nach 30 Tagen mit und ohne Pathogen-Inokulation und Neem-Zusatz (GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer, RG = Rakshak Gold)
 angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Die Gesamtkeimzahlen an der Wurzelspitze von Erbsenpflanzen (Tab.35) bewegten sich bei allen drei Versuchen und allen Varianten zwischen 10^9 und 10^{10} cfu / g Trockenmasse. Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten gab es kaum. Bei dem Klimakammer-Versuch in Aussaaterde wurden grundsätzlich geringere Werte ermittelt als bei den Gewächshausversuchen in Aussaaterde und Feldboden.

Im Substrat lagen die Gesamtkeimzahlen um ca. 2 Zehnerpotenzen unter denen an der Wurzelspitze. Gegenüber den vor den Versuchen ermittelten Ausgangswerten im Substrat war nach 30 Tagen Versuchsdauer in jedem Fall ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Zwischen den einzelnen Varianten bestanden bei beiden Versuchen in Aussaaterde keine statistisch zu sichernden Unterschiede. In Feldboden wurden bei den beiden Varianten mit Zusatz des Neem-Präparates die höchsten Gesamtkeimzahlen festgestellt (Tab.36).

Tab.35: Einfluss verschiedener Behandlungen auf die Gesamtkeimzahlen an der Wurzelspitze von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer [log cfu / g Trockenmasse]

GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer, RG = Rakshak Gold
angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Variante	Versuch		
	Feldboden (GWH)	Aussaaterde (GWH)	Aussaaterde (KK)
FZB47	9,66 defg	9,75 fg	9,41 abcd
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	9,56 cdef	9,77 fg	9,22 a
FZB47 + <i>R. solani</i>	9,52 bcdef	9,47 abcde	9,42 abcde
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	9,89 g	9,68 efg	9,30 abc
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	9,57 def	9,66 defg	9,27 ab

Tab.36: Einfluss verschiedener Behandlungen auf die Gesamtkeimzahlen im Substrat nach 30 Tagen Versuchsdauer [log cfu / g Trockenmasse]

GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer, RG = Rakshak Gold

angewandter Titer: jeweils 10^8 cfu *B. subtilis* / ml

Variante	Versuch					
	Feldboden (GWH)		Aussaaterde (GWH)		Aussaaterde (KK)	
Ausgangswert (vor Versuch)	6,59	a	7,38	bc	7,38	bc
FZB47	7,37	bc	7,69	de	7,91	e
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	7,36	bc	7,84	de	7,76	de
FZB47 + <i>R. solani</i>	7,22	b	7,69	de	7,68	de
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	7,60	cde	7,90	e	7,65	cde
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	7,57	cd	7,73	de	7,85	de

4.6.2 Aktivität von *Bacillus subtilis*

In der Rhizosphäre von Erbsenpflanzen wurden nach 30 Tagen Versuchsdauer Versporungsgrade von *Bacillus subtilis* von 59 % bis 100 % ermittelt (Tab.37). Die Unterschiede in der Aktivität der introduzierten Nutzbakterien waren bei dem Klimakammer-Versuch in Aussaaterde am geringsten.

Tab.37: Mittlerer Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* FZB47 in der Rhizosphäre von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer mit und ohne Pathogen-Inokulation und Zusatz des Neem-Präparates Rakshak Gold (RG)
GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer

Variante	Versuch		
	Feldboden (GWH)	Aussaaterde (GWH)	Aussaaterde (KK)
FZB47	76	59	97
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	85	89	86
FZB47 + <i>R. solani</i>	90	100	90
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	65	95	88
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	100	72	96

Im Bereich der Rhizoplane (Tab.38) war die Aktivität von FZB47 keineswegs größer. Die mittleren Versporungsgrade lagen hier im Bereich zwischen 71 % und 100 %. Tendenziell war beim Klimakammer-Versuch zumeist eine etwas geringere Aktivität von *Bacillus subtilis* zu ermitteln.

Am größten war die Aktivität der introduzierten Bakterien im Substrat (Tab.39). Die Versporungsgrade lagen hier zwischen 49 % und 95 %. Beim Vergleich der beiden Versuche im Gewächshaus fiel auf, dass mit einer Ausnahme (FZB47 + *Rhizoctonia solani*) die Versporungsgrade in Aussaaterde geringer waren als in Feldboden. Beim Gewächshaus-Versuch in Aussaaterde war die Aktivität von *Bacillus subtilis* mit Ausnahme von FZB47 allein höher als beim Klimakammer-Versuch im selben Substrat.

Tab.38: Mittlerer Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* FZB47 in der Rhizoplane von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer mit und ohne Pathogen-Inokulation und Zusatz des Neem-Präparates Rakshak Gold (RG)
GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer

Variante	Versuch	
	Aussaaterde (GWH)	Aussaaterde (KK)
FZB47	79	98
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	80	100
FZB47 + <i>R. solani</i>	100	99
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	83	81
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	71	100

Tab.39: Mittlerer Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* FZB47 im Substrat nach 30 Tagen Versuchsdauer mit und ohne Pathogen-Inokulation und Zusatz des Neem-Präparates Rakshak Gold (RG)

GWH = Gewächshaus, KK = Klimakammer

Variante	Versuch		
	Feldboden (GWH)	Aussaaterde (GWH)	Aussaaterde (KK)
FZB47	89	70	68
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	95	49	72
FZB47 + <i>R. solani</i>	56	64	79
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	82	68	84
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	80	58	75

4.6.3 Einfluss der Behandlungen auf das Pflanzenwachstum

Als Parameter für das vegetative Wachstum der Testpflanzen wurden Frischmasse von Spross und Wurzel sowie die Sprosslänge ermittelt. Bei den Versuchen in Aussaaterde erfolgte außerdem die Bestimmung der Trockenmasse von Spross und Wurzel.

Bei dem Gewächshausversuch in Feldboden wurden bei keinem der Wachstumsparameter signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten festgestellt (Tab.40). Es war auffällig, dass sowohl bei der mit *Phoma pinodella* als auch der mit *Rhizoctonia solani* inokulierten Kontrolle tendenziell niedrigere Wurzelfrischmassen ermittelt wurden als bei der unbehandelten Kontrolle. Demgegenüber waren Sprossfrischmasse und Sprosslänge gegenüber dieser erhöht. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Varianten mit *Bacillus subtilis* FZB47 allein und bei dem Neem-Präparat allein. Ansonsten war es kaum möglich, aus den sich

ergebenden Werten einen Einfluss der einzelnen applizierten Organismen und des Neem-Präparates auf das Pflanzenwachstum zu erkennen.

Das traf in ähnlicher Weise auch für den Gewächshausversuch in Aussaaterde zu (Tab.41). Zunächst ist festzustellen, dass die Erbsenpflanzen in diesem Substrat wesentlich wüchsiger waren als in Feldboden. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten ergaben sich aber auch hier kaum. Das Wurzelwachstum wurde in diesem Fall nur durch *Phoma pinodella* gegenüber der unbehandelten Kontrolle leicht gehemmt, das Sprosswachstum leicht gefördert. Bei der mit *Rhizoctonia solani* inokulierten Variante wurden für alle Wachstumsparameter höhere Werte ermittelt als bei der unbehandelten Kontrolle. Alle anderen Behandlungen führten zu niedrigeren Frisch- und Trockenmassen der Wurzel im Vergleich zur unbehandelten und mit den phytopathogenen Pilzen inokulierten Kontrolle. Die größte Sprossfrischmasse wurde ebenso wie die größte Sprosslänge bei der mit FZB47 allein behandelten Variante ermittelt.

In der Klimakammer war die Wuchsleistung der Erbsenpflanzen in Aussaaterde etwas geringer als unter Gewächshausbedingungen im gleichen Substrat (Tab.42). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten waren hier noch geringfügiger als beim Gewächshausversuch, sodass bei keinem der Wachstumsparameter statistisch zu sichernde Differenzen zwischen den Varianten festgestellt wurden. Durch die beiden phytopathogenen Pilze *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani* wurde das Sprosswachstum der Erbsenpflanzen gegenüber der unbehandelten Kontrolle tendenziell etwas reduziert, was die Werte für Sprossfrisch- und –trockenmasse sowie Sprosslänge zeigen. Jedoch wurden auch bei fast allen anderen Behandlungen, einschließlich der mit *Bacillus subtilis* und Rakshak Gold, für die genannten Wachstumsparameter im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle niedrigere Werte ermittelt. Die Wurzelfrischmassen waren bei der Kombination von FZB47 oder Rakshak Gold mit den pathogenen Pilzen größer als bei gemeinsamer Applikation von FZB47 und Rakshak Gold mit den pilzlichen Erregern.

Tab.40: Einfluss verschiedener Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer in Feldboden (Gewächshaus)
FM = Frischmasse, RG = Rakshak Gold

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Sprosslänge [cm]
Kontrolle (unbehandelt)	0,47	0,19	7,7
<i>P. pinodella</i>	0,58	0,17	8,3
<i>R. solani</i>	0,55	0,14	8,1
Rakshak Gold (RG)	0,51	0,12	7,7
FZB47	0,58	0,12	8,1
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	0,55	0,17	7,9
FZB47 + <i>R. solani</i>	0,57	0,19	8,1
<i>P. pinodella</i> + RG	0,47	0,15	7,4
<i>R. solani</i> + RG	0,48	0,15	7,7
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	0,44	0,13	7,1
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	0,59	0,20	8,6
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tab.41: Einfluss verschiedener Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer in Aussaaterde (Gewächshaus)
FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse, RG = Rakshak Gold

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	1,81	0,61	12,8	0,2455	0,0516
<i>P. pinodella</i>	1,87	0,57	13,1	0,2551	0,0490
<i>R. solani</i>	2,00	0,66	13,1	0,2738	0,0526
Rakshak Gold (RG)	1,94	0,56	13,0	0,2781	0,0450
FZB47	2,03	0,54	13,2	0,2728	0,0419
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	1,83	0,48	12,7	0,2583	0,0407
FZB47 + <i>R. solani</i>	1,75	0,55	11,8	0,2539	0,0452
<i>P. pinodella</i> + RG	1,83	0,54	12,3	0,2580	0,0448
<i>R. solani</i> + RG	1,88	0,51	12,5	0,2576	0,0429
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	1,76	0,44	12,0	0,2544	0,0373
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	1,87	0,49	12,3	0,2623	0,0414
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	0,15	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0,0099

Tab.42: Einfluss verschiedener Behandlungen auf das vegetative Wachstum von Erbsenpflanzen nach 30 Tagen Versuchsdauer in Aussaaterde (Klimakammer)

FM = Frischmasse, TM = Trockenmasse, RG = Rakshak Gold

Variante	FM Spross [g]	FM Wurzel [g]	Spross- länge [cm]	TM Spross [g]	TM Wurzel [g]
Kontrolle (unbehandelt)	1,37	0,64	11,0	0,1061	0,0405
<i>P. pinodella</i>	1,23	0,64	10,5	0,0958	0,0480
<i>R. solani</i>	1,29	0,65	10,8	0,0989	0,0447
Rakshak Gold (RG)	1,27	0,67	10,7	0,1005	0,0407
FZB47	1,21	0,56	10,4	0,0959	0,0381
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	1,17	0,62	10,2	0,0917	0,0395
FZB47 + <i>R. solani</i>	1,39	0,64	11,0	0,1103	0,0432
<i>P. pinodella</i> + RG	1,22	0,65	10,3	0,0975	0,0410
<i>R. solani</i> + RG	1,31	0,70	10,7	0,1074	0,0478
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	1,23	0,58	10,5	0,0980	0,0449
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	1,23	0,55	10,3	0,0959	0,0401
GD (HSD) 0,05	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

4.6.4 Einfluss der Behandlungen auf den Krankheitsbefall der Testpflanzen

Hinsichtlich des sichtbaren Krankheitsbefalls an den Erbsenpflanzen, ausgedrückt durch den Krankheitsindex, wurden größere Unterschiede zwischen den Varianten deutlich, als sich im Wuchsverhalten der Pflanzen äußerten.

Tab.43: Einfluss verschiedener Behandlungen auf den Krankheitsindex von Erbsenpflanzen in Feldboden nach 30 Tagen (Gewächshausversuch)

+ = signifikant überlegen (niedrigerer Krankheitsindex)

- = signifikant unterlegen (höherer Krankheitsindex)

0 = Varianten nicht verglichen

n.s. = nicht signifikant

Variante	Krankheitsindex [%]	Vergleich mit		
		Kontrolle	<i>P. pinodella</i>	<i>R. solani</i>
Kontrolle (unbehandelt)	22,2	0	+	+
<i>P. pinodella</i>	62,5	-	0	0
<i>R. solani</i>	40,5	-	0	0
Rakshak Gold (RG)	31,5	n.s.	+	+
FZB47	31,8	n.s.	+	+
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	47,3	-	n.s.	0
FZB47 + <i>R. solani</i>	40,2	-	0	n.s.
<i>P. pinodella</i> + RG	53,9	-	n.s.	0
<i>R. solani</i> + RG	39,7	-	0	n.s.
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	42,0	-	+	0
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	50,0	-	0	n.s.

Beim Gewächshausversuch in Feldboden (Tab.43) wurde bereits in der unbehandelten Kontrolle ein Krankheitsindex von 22,2 % festgestellt, hervorgerufen durch spontanen Krankheitsbefall im unsterilen Substrat. Die bei Behandlung mit FZB47 allein sowie Rakshak Gold allein ermittelten Werte lagen geringfügig höher als bei der unbehandelten Kontrolle, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch zu sichern. Die beiden mit *Phoma pinodella* bzw. *Rhizoctonia solani* inokulierten Kontrollen wiesen einen signifikant höheren Krankheitsbefall auf als die unbehandelte Kontrolle und die beiden anderen Varianten ohne Pathogen. Durch Behandlung mit *Bacillus subtilis* konnte der durch *Phoma pinodella* verursachte Krankheitsbefall an den Erbsenpflanzen tendenziell reduziert werden, ebenso durch Applikation des Neem-Präparates. Bei kombinierter Anwendung von FZB47 und Rakshak Gold war die Verminderung des

Krankheitsindex signifikant. Demgegenüber wurde bei Inokulation mit *Rhizoctonia solani* kein Synergie-Effekt durch die kombinierte Anwendung von *Bacillus subtilis* und dem Neem-Präparat erreicht. Der Krankheitsindex lag hier höher als bei alleiniger Applikation von FZB47 bzw. Rakshak Gold und auch noch über der mit *Rhizoctonia solani* inokulierten Kontrolle.

Tab.44: Einfluss verschiedener Behandlungen auf den Krankheitsindex von Erbsenpflanzen in Aussaaterde nach 30 Tagen (Gewächshausversuch)

+ = signifikant überlegen (niedrigerer Krankheitsindex)

- = signifikant unterlegen (höherer Krankheitsindex)

0 = Varianten nicht verglichen

n.s. = nicht signifikant

Variante	Krankheitsindex [%]	Vergleich mit		
		Kontrolle	<i>P. pinodella</i>	<i>R. solani</i>
Kontrolle (unbehandelt)	0,0	0	+	+
<i>P. pinodella</i>	32,7	-	0	0
<i>R. solani</i>	37,5	-	0	0
Rakshak Gold (RG)	3,8	n.s.	+	+
FZB47	0,0	n.s.	+	+
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	29,2	-	n.s.	0
FZB47 + <i>R. solani</i>	27,4	-	0	+
<i>P. pinodella</i> + RG	25,6	-	n.s.	0
<i>R. solani</i> + RG	28,0	-	0	+
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	25,0	-	+	0
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	26,3	-	0	+

Beim Gewächshausversuch in Aussaaterde (Tab.44) war im Mittel eine bessere Pflanzengesundheit festzustellen als in Feldboden. Ein spontaner Krankheitsbefall trat in der unbehandelten Kontrolle ebenso wie in der mit FZB47 behandelten Variante gar nicht auf, in der mit Rakshak Gold behandelten Variante wurde mit 3,8 % nur ein sehr niedriger Krankheitsindex registriert. Die Krankheitsindizes aller anderen Varianten lagen signifikant darüber. Bei Behandlung mit *Rhizoctonia solani* vermochten sowohl

Bacillus subtilis als auch das Neem-Präparat, einzeln und in Kombination, den Krankheitsbefall gegenüber der inokulierten Kontrolle statistisch nachweisbar zu reduzieren. Bei kombinierter Anwendung von FZB47 und Rakshak Gold war der Krankheitsindex etwas geringer als bei beiden Präparaten einzeln in Verbindung mit dem pathogenen Pilz. Bei *Phoma pinodella* wurde, wie schon in Feldboden, ausschließlich durch die kombinierte Anwendung von *Bacillus subtilis* und dem Neem-Präparat der Krankheitsbefall der Testpflanzen signifikant reduziert.

Tab.45: Einfluss verschiedener Behandlungen auf den Krankheitsindex von Erbsenpflanzen in Aussaaterde nach 30 Tagen (Klimakammer)

+ = signifikant überlegen (niedrigerer Krankheitsindex)

- = signifikant unterlegen (höherer Krankheitsindex)

0 = Varianten nicht verglichen

n.s. = nicht signifikant

Variante	Krankheits- index [%]	Vergleich mit		
		Kontrolle	<i>P. pinodella</i>	<i>R. solani</i>
Kontrolle (unbehandelt)	3,0	0	+	+
<i>P. pinodella</i>	43,3	-	0	0
<i>R. solani</i>	46,3	-	0	0
Rakshak Gold (RG)	5,6	n.s.	+	+
FZB47	9,0	n.s.	+	+
FZB47 + <i>P. pinodella</i>	33,8	-	+	0
FZB47 + <i>R. solani</i>	34,1	-	0	+
<i>P. pinodella</i> + RG	31,6	-	+	0
<i>R. solani</i> + RG	31,4	-	0	+
FZB47 + <i>P. pinodella</i> + RG	37,5	-	n.s.	0
FZB47 + <i>R. solani</i> + RG	32,0	-	0	+

Beim Klimakammer-Versuch in Aussaaterde (Tab.45) war der Krankheitsindex im Mittel auf einem höheren Niveau als beim Gewächshausversuch, aber nicht so hoch wie in Feldboden. Hier trat auch in den nicht mit *Phoma pinodella* bzw. *Rhizoctonia solani* inokulierten Varianten ein geringfügiger spontaner Krankheitsbefall auf. Wie in den

beiden vorangegangenen Versuchen, so war auch hier der Krankheitsindex bei beiden inokulierten Kontrollen signifikant höher als bei allen anderen Varianten. Bei *Rhizoctonia solani* wurde wiederum durch *Bacillus subtilis* und das Neem-Präparat einzeln und in Kombination eine statistisch gesicherte Reduktion des Krankheitsindex gegenüber der inokulierten Kontrolle erreicht. Bei Inokulation mit *Phoma pinodella* wurde der Krankheitsbefall der Erbsenpflanzen durch FZB47 und Rakshak Gold ebenfalls vermindert, jedoch war diese Verringerung bei kombinierter Anwendung von Nutzbakterien und Neem-Präparat nicht signifikant.

5 Diskussion

Bedeutung ökologischer und edaphischer Faktoren

Für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit nützlicher Rhizosphärebakterien in der landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Praxis reichen die Erfahrungen von *in vitro*-Tests nicht aus, da sie die unter Praxisbedingungen herrschenden ökologischen und edaphischen Faktoren nicht berücksichtigen. Diese haben entscheidenden Einfluss auf alle drei Grundvoraussetzungen für die Wirksamkeit von Nutzbakterien, nämlich deren Populationsdynamik, Aktivität und Produktion wirksamer Substanzen. Aus diesem Grund unterscheiden sich Ergebnisse aus *in vivo*-Versuchen oftmals deutlich von solchen aus *in vitro*-Tests. So stellten GROSCH et al. (1999) fest, dass der Stamm *Bacillus subtilis* FZB37 den phytopathogenen Pilz *Pythium aphanidermatum* *in vivo* nicht wirkungsvoll unterdrücken konnte, obwohl in vorangegangenen *in vitro*-Tests beste Ergebnisse gegen diesen Pilz erzielt worden waren (KREBS et al. 1998). Diskrepanzen zwischen antifungaler Leistung *in vitro* und *in vivo* fanden auch SCHMIEDEKNECHT et al. (2001). Aus derartigen Erfahrungen heraus hielt es KLOEPPER (1991) für günstiger, sich beim Screening potenzieller Antagonisten nur auf *in vivo*-Versuche zu konzentrieren und entwickelte zwei *in vivo*-Tests als mögliche Alternative zu *in vitro*-Verfahren. Wegen der Bedeutung ökologischer und edaphischer Faktoren für *Bacillus subtilis* als Pflanzenstärkungsmittel und „Bio-Fertilizer“ soll deren Rolle in den dargestellten Versuchen besonders herausgehoben und nachfolgend diskutiert werden.

Besiedlung von Samen, Wurzeln und Substrat

Einfluss der applizierten Dosis

Die Konzentration der für die Saatgutbehandlung verwendeten Sporensuspension von *Bacillus subtilis* widerspiegelte sich in der am behandelten Saatgut ermittelten Keimzahl, die sich direkt proportional zum angewandten Titer verhielt. Diese Tatsache stimmt mit Erkenntnissen von MCKNIGHT & ROSALL (1991) überein, die die Abhängigkeit der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* von der introduzierten Keimzahl und dem Wachstumsmedium herausstellen.

Die Anzahl anhaftender Bakterienkeime pro behandeltem Erbsensamen, die ca. zwei bis drei Zehnerpotenzen unter dem angewandten Titer lag, ist ein Verhältnis, das sich bei allen Versuchsreihen zeigte. Von ähnlichen Erfahrungen berichtet auch BOCHOW

(1994). Untersuchungen von JAMAL (1993) ergaben bei Tauchung von Möhrensamen ebenfalls eine Anzahl am Saatgut haftender *Bacillus subtilis*-Keime, die etwa zwei Zehnerpotenzen unterhalb der Konzentration der Sporensuspension lag, mit der die Tauchbehandlung erfolgte. Bei den eigenen Versuchen lagen ab Versuchsserie 2 die ermittelten Keimzahlen am behandelten Erbsensaatgut geringfügig unter denen der ersten Serie, wo bei gleicher Anwendungskonzentration von 10^8 cfu / ml etwa 10^6 cfu / Erbse erreicht wurden. Als Ursache dafür wird die Verwendung einer neuen Charge von *Bacillus subtilis*-Granulaten angesehen, die von der FZB Biotechnik GmbH zur Verfügung gestellt worden war. Zudem war der Stamm FZB24[®] ab Versuchsserie 2 durch FZB47 ersetzt worden. FUKUI et al. (1994) untersuchten elektronenmikroskopisch die Besiedlung von Zuckerrübensamen durch *Pseudomonas* spp. und *Bacillus subtilis*. Sie stellten eine ungleichmäßige Besiedlung der Samen durch *Bacillus subtilis* fest, wobei die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Populationsgröße der Bakterien als limitierender Faktor gesehen wird.

Bei der Interpretation der Resultate aus den eigenen populationsdynamischen Untersuchungen ist zu beachten, dass das Erbsensaatgut vor Behandlung oberflächlich desinfiziert worden war, d.h. potenzielle Konkurrenten von *Bacillus subtilis* waren ausgeschaltet worden. Die Bakterien hatten damit bevorzugte Ausgangsbedingungen für eine Besiedlung von Samen und Wurzel. So ist bekannt, dass auch die Bedingungen in der Spermosphäre die Wurzelbesiedlung über Saatgutbehandlung eingebrachter Bakterien signifikant beeinflussen können (MAHAFFEE & BACKMAN 1993).

Unterschiedliche Ausgangsbedingungen schlugen sich bei allen unseren Tests auch nach 30 Tagen Versuchsdauer noch in einer unterschiedlich starken Besiedlung der Rhizosphäre nieder. Besonders der Einfluss der applizierten Dosis ist nach dieser Zeit noch spürbar, was bisherige Erfahrungen bestätigt, sowohl bei *Bacillus subtilis* (FREIER et al. 1990a, MCKNIGHT & ROSALL 1991, KREBS et al. 1993, MALIES 1995) als auch bei fluoreszierenden Pseudomonaden (BULL et al. 1991).

In unserer Versuchsserie 1 wurde bei alleiniger Saatgutbehandlung bei der höchsten applizierten Konzentration (10^9 cfu / ml) bei allen Temperaturstufen auch an der Wurzel die höchste Besiedlungsdichte festgestellt. Die Unterschiede zur Variante mit dem niedrigsten angewandten Titer (10^7 cfu / ml) bewegten sich bei allen verwendeten Temperaturen allerdings unterhalb einer Zehnerpotenz und waren nur selten signifikant. Das bedeutet, dass sich Differenzen in der Ausgangsbesiedlung des Erbsensamens

durch Etablierung und Vermehrung von *Bacillus subtilis* über den Versuchszeitraum zunehmend verringern und dass die Bakterien in Quarzsand sich bei niedrigerer introduzierter Keimzahl schneller vermehren. Möglicherweise nähert sich die Populationsdichte des Nutzbakteriums im Wurzelbereich speziell bei hoher applizierter Dosis einem kritischen Wert an, welcher der maximalen Tragfähigkeit der Pflanzenwurzel für *Bacillus subtilis* entspricht. Das würde erklären, weshalb in Versuchsserie 1 bei kombinierter Saatgut- und Substratbehandlung mit 10^9 cfu / ml durch Temperaturerhöhung kaum mehr eine größere Populationsdichte von *Bacillus subtilis* an Erbsenwurzeln erreicht wurde. Der ermittelte Wert lag hier bei Temperaturen von 10 °C bis 25 °C immer im Bereich von 10^9 cfu / g Wurzeltrockenmasse. Ähnliche Erfahrungen sind von fluoreszierenden Pseudomonaden bekannt. KLUEPFEL (1993) beobachtete unabhängig von der applizierten Dosis innerhalb von acht Tagen die gleiche Bakteriendichte an Weizenwurzeln und schloss daraus, dass die zu einem frühen Zeitpunkt nach Introdution des *Pseudomonas aureofaciens*-Stammes ermittelten Populationsdichten an den Wurzeln deren Tragfähigkeit für diese Bakterien repräsentieren. Diese ist in sterilem Substrat größer als in natürlichem Boden.

Großen Einfluss auf die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* im Wurzelbereich hatte eine zusätzliche Substratbehandlung, insbesondere bei hohem angewandten Titer (10^9 cfu / ml). In diesem Fall lagen die ermittelten Keimzahlen im Wurzelbereich zum Teil um mehr als zwei Zehnerpotenzen über denen bei alleiniger Saatgutbehandlung. Auch von ALBRECHT (1995) wurde mit Substratapplikation und kombinierter Saatgut- und Substratapplikation die größte Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre erreicht. Die Gründe für diese Differenzen liegen offenbar darin, dass durch eine Substratbehandlung wesentlich mehr Bakterienkeime in das Beziehungsgefüge Pflanze – Substrat gelangen als durch alleinige Saatgutbehandlung. Das verdeutlicht folgendes Beispiel auf der Basis von Daten aus Versuchsserie 1: Auf der Oberfläche mit FZB24®-Sporensuspension 10^7 cfu / ml behandelter Erbsensamen wurden $4,27 \cdot 10^4$ *Bacillus subtilis*-Keime je Samen (= log cfu 4,63) wiedergefunden. Drei Samen wurden in jedes Gefäß gesät, d.h. bei alleiniger Saatgutbehandlung gelangten in 250 ml Quarzsand insgesamt $1,281 \cdot 10^5$ Sporen des Bakteriums. Bei kombinierter Anwendung wurden durch die Substratbehandlung zusätzlich $3,0 \cdot 10^8$ *Bacillus subtilis*-Keime (30 ml mit $1,0 \cdot 10^7$ Bakteriensporen) in jedes Gefäß eingebracht, also ca. 2340 mal soviel wie durch Saatgutbehandlung. So waren bei

kombinierter Anwendung nach 30 Tagen Versuchsdauer noch höhere Keimzahlen von *Bacillus subtilis* im Bereich der Rhizosphäre nachweisbar, obgleich der Unterschied zur alleinigen Saatgutbehandlung geringer als eine Zehnerpotenz war. Bei dem höchsten angewandten Titer von 10^9 cfu / ml FZB24[®] waren bei den niedrigeren Versuchstemperaturen (10 °C, 15 °C) nach 30 Tagen noch Unterschiede in der Besiedlungsdichte im Wurzelbereich in der Größenordnung von 10^3 cfu / g Wurzeltrockenmasse zwischen alleiniger Saatgutbehandlung und kombinierter Anwendung sichtbar. Ursache dafür scheint, dass die Bakterien im Wurzelraum bei höherer Ausgangskeimzahl sich langsamer vermehren – insbesondere bei niedrigen Temperaturen. Zudem dürfte bei einer Populationsdichte von etwa 10^9 cfu / g Wurzeltrockenmasse im Wurzelbereich durch Autokonkurrenz eine gewisse Populationssättigung erreicht sein, wodurch auch bei Steigerung der Temperatur kaum mehr eine höhere Besiedlungsdichte in der Rhizosphäre zu verzeichnen war.

Einfluss der Applikationsmethode

Eine Saatgutbehandlung ist im Vergleich zur Substratbehandlung effektiver, weil sich hier die eingebrachten Bakterien direkt an der Pflanze befinden und somit schneller und intensiver die Wurzel besiedeln können. In den eigenen Versuchen zeigte sich besonders bei einem angewandten Titer von 10^7 cfu / ml und niedriger Versuchstemperatur, dass eine zusätzliche Substratbehandlung zwar zu drei Zehnerpotenzen höheren Keimzahlen von *Bacillus subtilis* im Substrat führte, die Populationsdichte im Wurzelbereich jedoch nur unwesentlich (um weniger als eine Zehnerpotenz) erhöhte. Die von MALIES (1995) gegenüber der Saatgutbehandlung favorisierte Gießbehandlung in erdeloser Kultur kann für Quarzsand (oder auch Feldboden) nicht gelten, da die räumliche Ausbreitung der Bakterienpopulation hier wesentlich langsamer vor sich geht als in einem flüssigen Medium. Nach HOWIE et al. (1987) sowie WELLER & THOMASHOW (1994) ist die Wurzelbesiedlung durch PGPR ein Prozess, der sich in zwei Phasen vollzieht:

1. Vom Samen kommen die Bakterien in Berührung mit der auskeimenden Wurzelspitze. Mit dem Wachstum derselben gelangen diese passiv in tiefere Bodenschichten. Dabei verbleiben im Zuge des Wurzelwachstums einige Bakterien an der Wurzelspitze, während andere an älteren Wurzelteilen oder in der Rhizosphäre zurückbleiben.

2. Die an der Pflanzenwurzel verteilten Bakterien vermehren sich, bilden in nährstoffreichen Nischen Mikrokolonien, konkurrieren mit der autochthonen Mikroflora und behaupten sich im Wurzelraum.

Dabei ist Phase (2), nämlich die aktive Besiedlung des Wurzelraumes der Pflanze, der entscheidende Punkt, der PGPR von Nicht-Rhizosphärebakterien unterscheidet. Eine Saatgut- oder Pflanzgutbehandlung (z.B. Wurzeltauchung) gewährleistet, dass sich die applizierten Bakterien bereits zur Aussaat bzw. Pflanzung an dem Ort befinden, an dem sie ihre Wirkung entfalten sollen, sodass sofort Phase (2) beginnen kann. Das bietet Zeitgewinn und damit einen Konkurrenzvorteil gegenüber bodenbürtigen pilzlichen oder bakteriellen Organismen. Wurzelbesiedlung durch Rhizosphärebakterien schließt die Verbreitung von einer Inokulum-Quelle entlang der aktiv wachsenden Wurzel sowie Vermehrung und Wachstum in der Rhizosphäre ein (PARKE 1991). Diese grundlegenden Eigenschaften konnten für die verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämme bereits in unserer Versuchsserie 1 eindeutig nachgewiesen werden.

Einfluss der Temperatur

Die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre wurde als stark temperaturabhängig erkannt. Das Temperaturoptimum für die Populationsentwicklung liegt in sterilem Boden bei 25 °C (GUPTA & UTKHEDE 1986). Dies erklärt, weshalb die in der Rhizosphäre ermittelten Keimzahlen sich mit steigender Temperatur erhöhten. Bei 30 °C wurden allerdings auch noch höhere Besiedlungsdichten von *Bacillus subtilis* festgestellt als bei 25 °C, jedoch ist auch das in den eigenen Versuchen verwendete Substrat Quarzsand nicht als steril anzusehen. KILIAN et al. (2000) führten sich mit steigender Temperatur erhöhende Populationsdichten von *Bacillus subtilis* auf die entsprechend ansteigende Stoffwechselaktivität der Bakterienzellen zurück. Die in unseren Versuchsserien gefundene Temperaturabhängigkeit bei der Rhizosphärenbesiedlung des Bakteriums korreliert mit Ergebnissen von REDDY & RAHE (1989a), die bei Temperaturen von 22 °C-25 °C größere Populationsdichten von *Bacillus subtilis* feststellten als bei 17 °C-19 °C. Jedoch ist das Populationswachstum von *Bacillus*-Arten auch bei niedrigen Temperaturen belegt. KIM et al. (1997b) beobachteten noch bei 4 °C Wachstum von *Bacillus* sp. L324-92, was allerdings auch für Vertreter dieser Gattung ungewöhnlich sein dürfte. Die Fähigkeit zur Vermehrung innerhalb eines weiten Temperaturspektrums ist von Bedeutung, um auch bei ungünstigen Temperaturverhältnissen – etwa bei kühler Witterung nach Aussaat oder Pflanzung der

Kulturpflanzen im zeitigen Frühjahr – eine ausreichende Wurzelbesiedlung durch introduzierte PGPR und damit Pathogen unterdrückende und phytoeffektive Wirkungen absichern zu können.

Hinsichtlich Abhängigkeit von Temperatur sowie Behandlungsmodus zeigten sich bei der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* im Substrat ähnliche Tendenzen wie an den Wurzeln, jedoch auf niedrigerem Niveau. Niedrigere Keimzahlen des introduzierten Bakteriums im Substrat außerhalb der Rhizosphäre waren in Quarzsand zu erwarten. Die Ergebnisse stimmen überein mit Erfahrungen von KORTEMAA et al. (1997) mit *Streptomyces griseoviridis*. Dass im Quarzsand, der für *Bacillus subtilis* kaum eine Lebensgrundlage bietet, teilweise dennoch recht beachtliche Keimzahlen ermittelt wurden, ist einerseits darauf zurückzuführen, dass durch das ständige Wässern der Pflanzen vom Rhizosphärenbereich sowohl Keime des Nutzbakteriums wie auch Wurzelexsudate ins Substrat abgespült wurden. Andererseits wird bei den Varianten mit Substratbehandlung auch ein großer Teil der ursprünglich introduzierten Bakterien mit erfasst, der während der gesamten Versuchsdauer versport war und sich nicht vermehrt hat.

Räumliche Verteilung an der Pflanzenwurzel

Die Besiedlung von Pflanzenwurzeln und einzelnen Wurzelabschnitten durch introduzierte Bakterien erfolgt keineswegs gleichmäßig. Einzelne Wurzeln derselben Pflanze variieren hinsichtlich ihres Alters, ihrer Morphologie und Physiologie sowie der Freisetzung von Wurzelexsudaten (BOWEN & ROVIRA 1976, KLUEPFEL 1993). So hat die Tatsache, dass in der oberen Bodenschicht 25 % bis 50 % aller Wurzeln abgestorben sein können, entscheidenden Einfluss auf Populationen von Mikroorganismen (KLUEPFEL 1993). Auf Grund dieser Erkenntnis wurden in den eigenen Versuchen einzelne Wurzelabschnitte im Hinblick auf deren Besiedlung mit dem introduzierten Nutzbakterium *Bacillus subtilis* untersucht. Dabei fiel auf, dass die peripheren Wurzelteile auch bei einfacher Saatgutbehandlung in keinem Fall die am geringsten besiedelten Teile der Wurzel waren. Im Mittel wurden die höchsten Keimzahlen sogar im Bereich der Wurzelspitzen ermittelt, die jene an Wurzelmittel- und -oberteil teilweise signifikant überstiegen. Für diese Tatsache können mehrere Faktoren eine Rolle spielen, wie sie für den Besiedlungsprozess der Pflanzenwurzel auch im Allgemeinen von Bedeutung sind:

1. Verteilung durch Sickerwasser. Durch das tägliche Gießen gelangen auf passive Weise ständig Keime von *Bacillus subtilis* aus den oberen Schichten des Substrats sowie aus den oberen Wurzelbereichen nach unten, also auch an die peripheren Wurzelteile. Die passive Verteilung von Mikroorganismen entlang der Wurzel durch Sickerwasser ist mehrfach belegt (CHAO et al. 1986, PARKE et al. 1986, BOWEN 1991). Dabei hielten PARKE et al. (1986) diesen Mechanismus für die Verteilung der Bakterien in tiefere Bodenschichten für entscheidender als das Mitwachsen mit der Pflanzenwurzel. Der Effekt von Sickerwasser auf die vertikale Ausbreitung der Bakterien ist zwar für die Wurzelbesiedlung eingebrachter PGPR nicht zwingend erforderlich (BAHME & SCHROTH 1987, HOWIE et al. 1987, BULL et al. 1991), kann aber eine entscheidende Rolle bei deren Transport über lange Distanzen spielen (LIDDELL & PARKE 1989). In Quarzsand der verwendeten Korngrößenklasse ist auf Grund der grobporigen Struktur mit einer raschen Abwärtsbewegung des Gießwassers zu rechnen und damit einer raschen Verteilung von *Bacillus subtilis*-Keimen auch in den unteren Teilen des Versuchsgefäßes.
2. Mitwachsen mit der Pflanzenwurzel. Durch die wachsende Wurzel werden Bakterienkeime, die sich an ihr befinden, auch in tiefere Schichten befördert (HOWIE et al. 1987, BOWEN 1991).
3. Höhere Vermehrungsrate an der Wurzelspitze. Die Wurzelspitzen sind die physiologisch aktiven Teile der Wurzel, geben also auch bevorzugt Wurzelexsudate ab (KILIAN et al. 2000), die gerade in einem solchen Substrat wie Quarzsand die nahezu einzige Lebensgrundlage für *Bacillus subtilis* darstellen. Daher können sich die Bakterien vorzugsweise im Bereich der Wurzelspitzen gut vermehren, sodass in diesem Bereich auch die größte Besiedlungsdichte festzustellen war. Die Beeinflussung des Besiedlungsverhaltens durch Wurzelexsudate ist dabei kein einseitiger Prozess. Es ist bekannt, dass Rhizosphärebakterien durch Produktion von Phytohormonen, Vitaminen, Toxinen, Enzymen und anderen Verbindungen oder durch Veränderung der Nährstoffverfügbarkeit die Freisetzung von Wurzelexsudaten durch die Pflanze um mehr als 100 % erhöhen können (KLUEPFEL 1993).
4. Motilität. Außer einer erhöhten Vermehrungsrate an der Wurzel kommt auch eine Eigenbewegung der Bakterienzellen im Bodenwasser in Richtung der physiologisch aktiven Wurzelspitze in Betracht. Da die Besiedlung von Kartoffelwurzeln durch

einen *Pseudomonas fluorescens*-Stamm, der keine funktionsfähigen Geißeln ausbilden konnte, beeinträchtigt war, hielten SCHIPPERS et al. (1987) die Motilität für einen essenziellen Faktor im Prozess der Wurzelbesiedlung durch fluoreszierende Pseudomonaden. BOWEN & ROVIRA (1976) sahen Geißeln jedoch nicht für bedeutungsvoll für die bakterielle Eigenbewegung im Boden an. SCHULZ & WOLF (2001) beobachteten beim Einsatz von Pseudomonaden-Mutanten mit reduzierter *in vitro* Motilität sogar eine verstärkte Wurzelbesiedlung *ad planta*.

5. Chemotaxis, also durch chemische Reize in ihrer Richtung beeinflusste freie Ortsbewegung von Organismen. Als Reizquelle dürften bei der Wurzelbesiedlung durch introduzierte Bakterien im Wesentlichen bestimmte Bestandteile von Wurzelexsudaten in Frage kommen, die im Bereich der Wurzelspitze in besonderem Maß produziert werden. SCHER et al. (1985) betrachteten Chemotaxis als den ersten Schritt der Besiedlung von Samen und Wurzeln der Sojabohne durch Bakterien.

MCKNIGHT & ROSALL (1991) untersuchten zwar nicht die Besiedlung einzelner Wurzelabschnitte durch *Bacillus subtilis*, stellten aber fest, dass die gesamte Wurzel 10 Tage alter Baumwollsämlinge über die gesamte Länge, auch im peripheren Bereich, mit den Bakterien besiedelt war. ALBRECHT (1995) beobachtete nach Saatgutbehandlung mit *Bacillus subtilis* zunächst eine verstärkte Besiedlung der oberen und mittleren Wurzelteile von Radieschenpflanzen gegenüber der Wurzelspitze. Am Ende des Versuchszeitraumes von 31 Tagen waren diese Unterschiede jedoch nicht mehr vorhanden. Bei *Bacillus* spp. deuten Versuchsergebnisse – auch die eigenen – darauf hin, dass sie die Pflanzenwurzel innerhalb kurzer Zeit recht gleichmäßig besiedeln können. BOCHOW (1994) nennt die Wurzelspitze als bevorzugten Besiedlungsort von *Bacillus subtilis*. Im Gegensatz dazu wird bei *Pseudomonas*-Arten zwar ebenfalls von einer Besiedlung der gesamten Wurzel berichtet (WELLER 1983), vielfach wurden hier aber die größten Keimzahlen im oberen Wurzelbereich, also in der Nähe des Samens, ermittelt (WELLER 1986, BAHME & SCHROTH 1987, RYDER & BORRETT 1991, LEEMAN et al. 1995, SCHMIDT et al. 2000b). CHET et al. (1991) fanden bei *Serratia marcescens* im Rhizosphärenbereich die größte Populationsdichte im basalen Teil der Wurzeln, die in Richtung der Wurzelspitze zwar abnahm, an der Spitze selbst jedoch wieder anstieg. HOZORE & ALEXANDER (1991) sehen in der Mobilität von Bakterien entlang der Wurzel ein entscheidendes Kriterium für ihre Fähigkeit zur erfolgreichen Rhizosphärenbesiedlung. WELLER (1988) definiert Bakterien als „Wurzelbesiedler“,

wenn sie sich nach Einbringung entlang der Pflanzenwurzel in natürlichem Boden ausbreiten, vermehren und über mehrere Wochen hinweg in Gegenwart der autochthonen Mikroflora im Boden überleben können. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurden für *Bacillus subtilis* diese Eigenschaften nachgewiesen, sodass hier von einem guten Wurzelbesiedler gesprochen werden kann. Die unterschiedlichen, sich teilweise widersprechenden Aussagen zur räumlichen Verteilung von Rhizosphärebakterien an der Pflanzenwurzel in der Literatur und die Gegenüberstellung mit den eigenen Ergebnissen machen deutlich, dass es in dieser Hinsicht offenbar art- und stammspezifische Unterschiede gibt und dass die beispielsweise für *Pseudomonas* spp. dargestellten Erkenntnisse nicht auf *Bacillus subtilis* übertragbar sind. Allerdings fanden auch LIU & SINCLAIR (1993) bei introduzierten *Bacillus megaterium* an den Wurzeln von Sojabohnen abnehmende Keimzahlen in Richtung Wurzelspitze. Die Ursachen für die Differenzen zu den eigenen Versuchsergebnissen sind offenbar in der Methodik zu suchen. Zwar sind die Wurzelspitzen bevorzugte Besiedlungsorte von *Bacillus subtilis*, jedoch ist andererseits dessen Etablierung in oberen, gut durchlüfteten Bodenschichten wegen seines Sauerstoffbedarfs am besten (BOCHOW 1989, FREIER et al., 1990a). Im grobporigen Quarzsand und bei der geringen Tiefe der Versuchsgefäße war überall in den Gefäßen eine gute Belüftung gewährleistet. Dem passiven Transport der Bakterien, etwa durch Sickerwasser, wird generell sehr große Bedeutung beigemessen, da dieser die Besiedlung der peripheren Wurzelteile erleichterte.

Einfluss des Trägerstoffs

Die in den beschriebenen drei Versuchen von Versuchsserie 2 festgestellte Abhängigkeit der Populationsdichte des untersuchten Nutzbakteriums im Rhizosphärenbereich von Temperatur sowie Behandlungsmodus bestätigen die gewonnenen Erkenntnisse aus der ersten Versuchsserie. Es zeigte sich zudem, dass der zur Herstellung des *Bacillus subtilis*-Granulats verwendete Trägerstoff (Sand, Kaliumnitrat oder Maisstärke) keinen entscheidenden Einfluss auf das Besiedlungsverhalten des Bakteriums hat. Es ist jedoch bekannt, dass unterschiedliche Formulierungen die Überlebensfähigkeit und antifungale Leistung introduzierter Bakterien beeinflussen können (GASONI et al. 1998). XI et al. (1996) beobachteten eine bessere Wurzelbesiedlung von fluoreszierenden Pseudomonaden bei Applikation in Torf-Formulierung im Vergleich zu einer Formulierung als Granulat. Im Zusammenhang mit der Formulierung wird von FREIER et al. (1990a) ein hoher

Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* in der Kulturlösung als günstig angesehen, um hohe Überlebensraten der Bakterien im Boden zu erreichen. Da für die eigenen Versuche ausschließlich Granulat-Formulierungen mit 100 % versporteten Zellen verwendet wurden und angesetzte Sporensuspensionen sofort für die entsprechenden Behandlungen verwendet wurden, ist damit von guten Voraussetzungen für die Etablierung der verwendeten *Bacillus subtilis*-Isolate im Substrat auszugehen.

Einfluss phytopathogener Pilze

Es ist wahrscheinlich, dass die geringere Ausgangsbesiedlung durch die etwas geringere Zahl am Saatgut anhaftender *Bacillus subtilis*-Keime in Versuchsserie 2 Hauptgrund für die Unterschiede in der Populationsdichte zwischen Versuchsserie 1 (ohne Pathogen) und Versuchsserie 2 (mit *Phoma pinodella*) ist. Der Einfluss der Anwesenheit von *Phoma pinodella* auf die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* wird als gering eingeschätzt. In Feldeboden (Versuchsserie 3) wurde die Keimzahl des Nutzbakteriums an den Pflanzenwurzeln durch das Vorhandensein von *Phoma pinodella* nicht negativ beeinflusst. Hier wurden bei Anwesenheit des Pathogens mehrfach sogar etwas höhere Besiedlungsdichten des Bakteriums an den Pflanzenwurzeln ermittelt. Eine ähnliche Feststellung machte WELLER (1983) mit einem *Pseudomonas fluorescens*-Stamm zur Unterdrückung von *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Auch LIU & SINCLAIR (1988) sowie LIU & SINCLAIR (1992) stellten bei Befall mit *Rhizoctonia solani* keine Verminderung der Besiedlungsdichte des zuvor introduzierten *Bacillus megaterium*-Stammes in der Rhizosphäre von Sojabohnen fest. HWANG & CHAKRAVARTY (1992) beobachteten ebenfalls keine Reduktion der Populationsdichten von *Bacillus subtilis* durch zwei inokulierte *Rhizoctonia solani*-Isolate. Andererseits ist bekannt, dass der krankheitsunterdrückende Effekt des Bakteriums auch auf eine Reduktion der Population des Pathogens zurückzuführen ist (HWANG & CHAKRAVARTY (1992).

Einfluss des *Bacillus subtilis*-Stammes

Einzelne Stämme des Nutzbakteriums *Bacillus subtilis* können sich populationsdynamisch unterschiedlich verhalten (REDDY & RAHE 1989b, BOCHOW 1994, MALIES 1995). Unterschiede zwischen einzelnen Isolaten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, sich in stabilen Populationen in der Rhizosphäre zu erhalten, sind auch von fluoreszierenden Pseudomonaden bekannt (LOPER et al. 1985). Die *Bacillus subtilis*-Stämme FZB24[®] bzw. FZB47 und FZB27 zeigten in den Versuchsserien 1 und 2 ein

sehr ähnliches Besiedlungsverhalten, wobei nach den vorliegenden Ergebnissen die Vermehrungsrate von FZB27 als etwas geringer eingeschätzt wird. Ab Versuchsserie 2 wurde an Stelle von FZB24[®] der Stamm FZB47 verwendet, der eine Streptomycin-resistente Mutante von FZB24[®] darstellt. Obwohl das populationsdynamische Verhalten der beiden *Bacillus subtilis*-Isolate als ähnlich angesehen wird, gab es Hinweise auf ein etwas langsames Wachstum von FZB47. Das Problem der Verwendung ähnlich markierter Bakterienstämme für populationsdynamische Untersuchungen greifen MCKNIGHT & ROSALL (1991) auf. Sie arbeiteten mit einem Rifampicin-resistenten *Bacillus subtilis*-Stamm. Obwohl die Autoren ein ähnliches Wachstum wie beim Ausgangsstamm beobachteten, sind sie der Meinung, dass die Veränderungen im Genotyp die Aussagekraft solcher Versuche zur Wurzelkolonisierung mit Antibiotika-resistenten Stämmen einschränken. Dass es Unterschiede zum Ausgangsstamm gab, äußerte sich auch in einem rascheren Nachlassen der Aktivität der Rifampicin-resistenten Mutante gegen *Rhizoctonia solani*. Die Autoren halten daher eine Markierung von *Bacillus subtilis* für populationsdynamische Untersuchungen mit Lux-Genen für geeigneter, da sie hier mit keinen das Besiedlungsverhalten beeinflussenden phänotypischen Veränderungen rechnen. Eine Verwendung von solcher Art markierten Isolaten war im Rahmen der eigenen Arbeit leider nicht möglich.

Einfluss des Substrates

Beim Vergleich der in Feldboden erhaltenen Resultate über das Besiedlungsverhalten von *Bacillus subtilis* mit den in Quarzsand gewonnenen Erkenntnissen fiel zunächst auf, dass die an den Pflanzenwurzeln ermittelten Keimzahlen des Bakteriums in Feldboden deutlich niedriger lagen als in Quarzsand. Dieses Ergebnis war zu erwarten und korreliert mit den Feststellungen von BAHME & SCHROTH (1987), die von introduziertem *Pseudomonas fluorescens* in leichtem Boden (sandiger Lehm) etwa eine Zehnerpotenz mehr Keime wiederfanden als in schwererem Boden (schluffiger Ton-Lehm). BRÜCKNER (1998) geht von einem geringen Einfluss unterschiedlicher Bodenarten auf die Populationsdichte von Rhizosphärebakterien aus, allerdings dürften die Eigenschaften der von ihm verwendeten Substrate (sL, lS und l‘S) auch nicht so weit auseinander liegen wie die von Quarzsand und Feldboden.

Die Gründe für den starken Einfluss des verwendeten Substrates auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* werden in Folgendem gesehen:

1. Der Feldboden, vermischt mit Einheitserde Typ Null, ist biologisch aktiver als Quarzsand. Das bedeutet, die introduzierten Bakterien sind einem wesentlich stärkeren *Konkurrenzdruck* ausgesetzt und können sich nicht so ungehindert entwickeln wie in Quarzsand. Von mehreren Autoren wird die Konkurrenz der autochthonen Mikroflora als entscheidender Einflussfaktor auf die Populationsdynamik introduzierter PGPR gesehen (HIRTE 1977, HEYNEN et al. 1988, BOCHOW 1994, BOCHOW & GANTCHEVA 1995). Bei populationsdynamischen Studien an *Rhizobium leguminosarum* stellten POSTMA & VAN VEEN (1991) eine signifikante Reduktion der Population bei Anwesenheit anderer Bakterien und Flagellaten im Vergleich zu sterilisierten Boden fest und ermittelten die geringsten Besiedlungsdichten in natürlichem Boden.
2. Der grob gesiebte Feldboden weist eine geringere Porengröße und damit ein größeres Matrixpotenzial auf als Quarzsand. Daher ist die *Durchlüftung* des Substrates nicht in der Weise gewährleistet wie im Quarzsand. Viele Poren sind durch die Kapillarität mit Wasser gefüllt und damit ist der Sauerstoffvorrat im Boden geringer (HOWIE et al. 1987). Durch eine geringe Porengröße und schlechtere Durchlüftung wird die Entwicklung und Aktivität eines Sauerstoff liebenden Bakteriums wie *Bacillus subtilis* ungünstig beeinflusst (SONI & KANWAR 1989).
3. Quarzsand ist ein Medium frei von organischer Substanz. Wie bereits diskutiert, stellen die Pflanzenwurzeln und deren Ausscheidungen (Wurzelexsudate) in einem derartigen Substrat die einzige Lebensgrundlage für die eingebrachten Bakterien dar. Die größte *Attraktivität zur Besiedlung* hat die Wurzel für Bakterien, die von den Wurzelexsudaten abhängig sind (NEWMAN & WATSON 1977). In dem mit Einheitserde 0 vermischten Feldboden ist auch die darin vorhandene organische Substanz eine Nahrungsquelle für *Bacillus subtilis*, sodass die Attraktivität der Wurzel zur Besiedlung in diesem Substrat geringer ist. POSTMA & VAN VEEN (1991) kamen bei ihren Untersuchungen an Rhizobien zu ähnlichen Ergebnissen. Sie fanden heraus, dass sich die Zahl der an Bodenpartikel gebundenen Rhizobien unter wachsendem Konkurrenzdruck weniger stark reduzierte als die Gesamtpopulation und dass die Keimzahl partikelgebundener Rhizobien in nicht sterilisiertem Boden um das 10 bis 20fache gegenüber sterilisiertem Substrat anstieg.
4. In Feldboden ist eine veränderte *Zusammensetzung der Wurzelexsudate*, die von der Pflanze abgegeben werden, im Vergleich zu den Bedingungen im Quarzsand

denkbar. Das könnte entsprechende Auswirkungen auf das Bakterienwachstum in der Rhizosphäre haben. So stellten GAMLIEL & KATAN (1992) fest, dass die Zusammensetzung von Samen- und Wurzelexsudaten von Tomatenpflanzen in solarisierten Böden eine andere war als in nicht-solarisierten. In solarisierten Böden war der Anteil an Zuckern niedriger und der von Aminosäuren höher, was sich ungünstig auf das Bakterienwachstum auswirkte.

5. Der *pH-Wert* des mit Einheitserde Typ Null vermischten Feldbodens lag mit 5,68 in einem für die Populationsentwicklung von *Bacillus subtilis* ungünstigerem Bereich im Vergleich zu Quarzsand (6,78). REDDY & RAHE (1989a) gaben neben hohen Temperaturen und hoher Bodenfeuchte auch hohe pH-Werte als günstig für das Überleben von *Bacillus subtilis* in der Rhizosphäre an. Ein pH-Wert von 6,5 war günstiger zu beurteilen als 4,5 und 5,5.

pH-Wert und Bodenfeuchte werden dabei zwar von REDDY & RAHE (1989a) als weniger entscheidend angesehen als die Temperatur, jedoch dürften die vier eben genannten Fakten in ihrer *Summe* stärkere Einflussfaktoren auf die Populationsdichte des Nutzbakteriums sein als die Temperatur. POSTMA & VAN VEEN (1991) kamen zu der Erkenntnis, dass die Kombination der Zugabe von räuberischen Flagellaten und Bakterien als potenzielle Konkurrenten die Population introduzierter Rhizobien wesentlich stärker reduzierte als die Zugabe einer der beiden Organismengruppen.

Das ökologische System des mit Einheitserde Typ Null durchmischten Feldbodens ist insgesamt wesentlich komplexer als das des Quarzsandes. Die Korngröße des Bodens ist heterogener, organische Substanz ist vorhanden, der Gehalt an verfügbaren Nährstoffen, die mikrobielle Aktivität sind wesentlich höher, das Puffervermögen ist deutlich größer als in Quarzsand. Es kommen bei dem in dieser Versuchsserie verwendeten Substrat also eine ganze Reihe von Faktoren hinzu, welche die Entwicklung der eingebrachten Mikroorganismenpopulation beeinflussen. Je vielgestaltiger die ökologischen Bedingungen sind und je mehr Einflussfaktoren für das Besiedlungsverhalten des introduzierten Bakteriums von Wichtigkeit sind, desto mehr verliert der einzelne Einflussfaktor an Bedeutung. Damit ist zu erklären, weshalb selbst Temperaturdifferenzen von 10 °C in diesem Substrat nur marginale Unterschiede bei der Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* an den Pflanzenwurzeln verursachten und der Temperatureinfluss in Feldboden eine viel geringere Bedeutung hat als in Quarzsand.

Die Nährstoffverfügbarkeit stellt ein wichtiges Kriterium für die Zusammensetzung der autochthonen Mikroflora dar. Ihre Änderung – etwa durch Zugabe von Nährstoffen – hat Verschiebungen in der Zusammensetzung der Bodenmikroflora zur Folge, indem bestimmte Mikroorganismen gefördert, andere jedoch gehemmt werden. UTKHEDE & SMITH (1991) fanden Hinweise darauf, dass die Anwendung von Stickstoff, allein oder in Kombination mit Phosphor, jene Mikroorganismen hemmt, die die Bodenmüdigkeit bei Apfel („Apple Replant Disease“) verursachen, bzw. deren Antagonisten fördert. Dabei ist es nicht nur von Bedeutung, welche Nährstoffe zugesetzt werden, sondern auch in welcher Form sie verabreicht werden. So erzielten ISSOUFOU (2000) sowie SCHMIEDEKNECHT et al. (2001) in Landy-Medium oder Nährlösungen mit Nitrat-Stickstoff bessere Wachstums- und Sporulationsraten von *Bacillus subtilis* im Vergleich zu Nährlösungen, die nur Ammonium-Stickstoff enthielten. Für die Interpretation der eigenen Versuchsergebnisse ist diese Tatsache insofern von Bedeutung, als durch die unterschiedliche Nährstoffsituation in den verwendeten Substraten neben einer direkten Beeinflussung des Wachstums von *Bacillus subtilis* auch eine veränderte Konkurrenzsituation in Abhängigkeit vom Substrat zu erwarten ist, nicht nur quantitativ (ausgedrückt durch die Gesamtkeimzahl), sondern auch qualitativ (ausgedrückt durch die vorkommenden Mikroorganismenarten).

Einen stärkeren Einfluss als die Temperatur hatte bei Versuchsserie 3 die introduzierte Menge an *Bacillus subtilis*-Keimen. Eine höhere Ausgangsbesiedlung, die durch Erhöhung der Konzentration der applizierten Sporensuspension erreicht wurde, konnte sich wie in den Versuchen mit Quarzsand bis zum Ende der Versuche nach 30 Tagen erhalten.

Mit dem 60 Tage dauernden Langzeitversuch ließ sich nachweisen, dass die verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämme FZB47 und FZB27 auch über diesen Zeitraum stabile Populationen im Feldboden bilden. Dies galt im Besonderen für FZB47, bei dem sich die Keimzahl im Substrat nach 30 und nach 60 Tagen nicht signifikant unterschied und auch tendenziell kaum eine Differenz erkennbar war. Obgleich als Begründung für diese Erkenntnis auch die Fähigkeit der Bakterien zur Bildung sehr dauerhafter Endosporen in Betracht kommt, zeigte dieser Versuch jedoch auch, dass *Bacillus subtilis* eine ausreichende Konkurrenzfähigkeit besitzt, um sich über einen längeren Zeitraum im Boden zu erhalten. FREIER et al. (1990b) fanden bei dem *Bacillus subtilis*-Stamm T99 unter Praxisbedingungen einen stabilen Titer von ca. 10^4 cfu / g Erds substrat

über eine 14-monatige Versuchsdauer und interpretierten dies als Beleg für die Konkurrenzfähigkeit des Bakteriums. Auch HALL & EDGAR DAVIS (1990) konnten noch 12 und 24 Monate nach Introduktion *Bacillus subtilis* an Ahorn-Sämlingen nachweisen. LIU & SINCLAIR (1991) sowie LIU & SINCLAIR (1992) schreiben ihrem nahe mit *Bacillus subtilis* verwandten Modellorganismus *Bacillus megaterium* auf Grund ihrer Versuchsergebnisse eine gute Konkurrenzfähigkeit mit der autochthonen Mikroflora, eine enge Beziehung zur Kulturpflanze, die Fähigkeit zur Besiedlung von Pflanzenwurzeln und Rhizosphäre sowie eine lange Überlebensfähigkeit im Boden zu.

Populationsentwicklung innerhalb von 30 Tagen

Wichtige Erkenntnisse über die Populationsentwicklung und Aktivität der Nutzbakterien lieferten unsere Einzelversuche (s. Abschnitt 4.5), die sowohl in Quarzsand als auch in Feldboden durchgeführt wurden. Die bei dem Versuch in Quarzsand verschiedentlich festgestellte leichte Erhöhung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in Rhizosphäre und Rhizoplane belegt, dass die Bakterien sich im Wurzelbereich nach ihrer Einbringung etablieren und vermehren können. Die bereits fünf Tage nach der Aussaat recht hohe Populationsdichte belegt die schnelle Etablierung von *Bacillus subtilis* im Bereich der Pflanzenwurzel. Dass in diesem Fall die größte Besiedlungsdichte und die größte Aktivität im Bereich der Rhizoplane gefunden wurden, kann als Beweis für die enge Beziehung der Bakterien mit der Pflanzenwurzel gelten.

Diese wurde auch durch einen Vorversuch belegt, bei dem unter weitgehend sterilen Bedingungen mit *Bacillus subtilis* behandelte Erbsenpflanzen in autoklaviertem Quarzsand angezogen wurden. Trotzdem die Erbsenwurzeln nach Versuchsende mit sterilem Wasser abgespült wurden, waren im elektronenmikroskopischen Bild eine Vielzahl von *Bacillus subtilis*-Zellen auf der Wurzeloberfläche zu erkennen, die teilweise in leichten Vertiefungen saßen (Abb.29 und 30). Inwiefern sie auch in die Pflanzenwurzel eindringen können, war durch den Versuch nicht eindeutig zu klären. Jedoch fanden MCINROY & KLOPPER (1991) sowie PLEBAN et al. (1995) Vertreter der Gattung *Bacillus* als endophytische Bakterien in mehreren Kulturpflanzen.

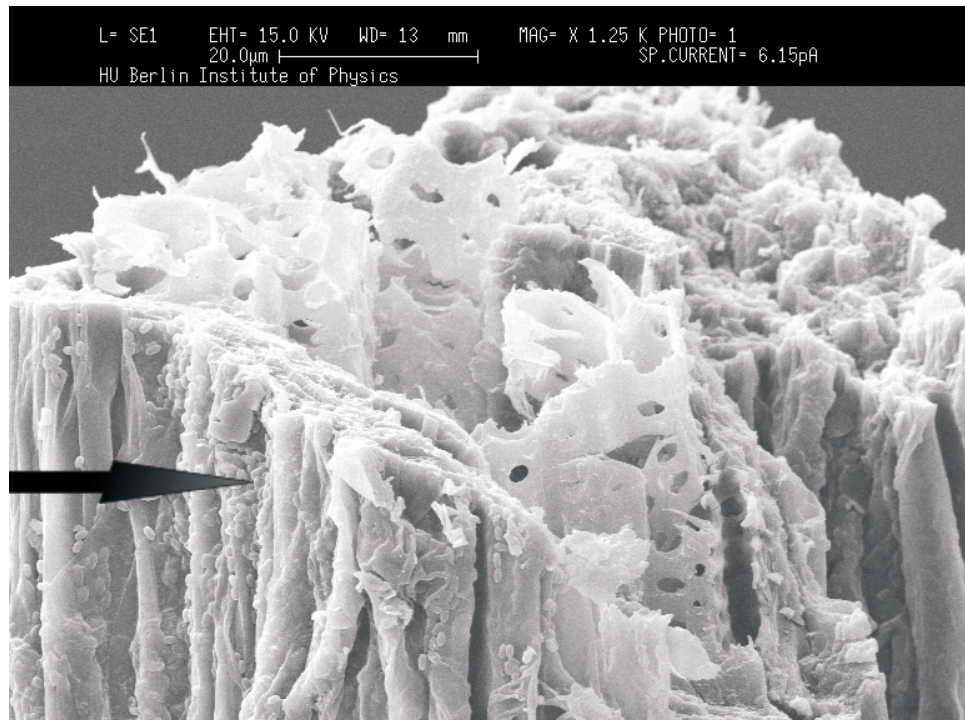


Abb.29: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Bacillus subtilis* (Pfeil) an Erbsenwurzeln (Foto: Natalja Wolff)

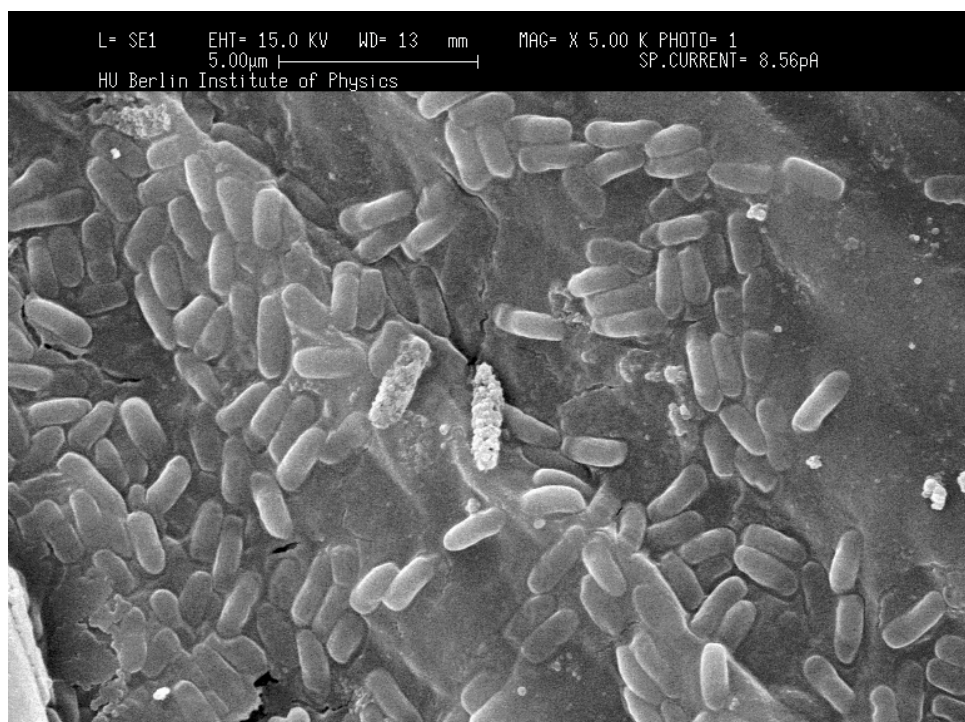


Abb.30: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Bacillus subtilis* an Erbsenwurzeln, weiter vergrößert (Foto: Natalja Wolff)

Auch SCHIPPERS et al. (1991) erwähnen, dass Rhizobakterien nicht nur außen im Wurzelbereich, sondern auch im Wurzelgewebe leben können. KIM et al. (1997a) konnten den introduzierten *Bacillus*-Stamm L324-92R₁₂ auch im Inneren von Weizenwurzeln nachweisen.

Während in Quarzsand die Affinität von *Bacillus subtilis* zur Wurzel als recht hoch einzuschätzen ist, zeigte sich im Feldboden ein anderes Bild. Hier wurde die größte Aktivität des Bakteriums im Substrat ermittelt. Während im Bereich der Rhizoplane zumeist deutlich geringere Keimzahlen gefunden wurden als in Quarzsand, wurden im Substrat häufig sogar höhere Werte festgestellt. Für dieses Phänomen wird in erster Linie der Gehalt an organischer Substanz im Feldboden verantwortlich gemacht, der durch das Einmischen der auf Torf basierenden Einheitserde Typ Null noch deutlich erhöht worden war. Außerdem könnte der im Vergleich zum Quarzsand höhere Nährstoffgehalt im Feldboden eine Rolle gespielt haben. So kann *Bacillus subtilis* im Feldboden auch von abgestorbener organischer Substanz leben, während in Quarzsand die Wurzelexsudate der Pflanzen die nahezu einzige Lebensgrundlage für die Bakterien darstellen. Ein weiterer Punkt, der zu berücksichtigen ist, ist die mikrobielle Konkurrenz. Diese ist in dem biologisch wenig aktiven Quarzsand nur spärlich vorhanden. Gleich zu Versuchsbeginn in großer Menge appliziert, hat *Bacillus subtilis* hier beste Chancen, sich als Erstbesiedler auf Samen und Keimwurzel zu etablieren. Beim Feldboden gelangt das Nutzbakterium bereits in ein biologisch wesentlich aktiveres und ökologisch diverseres Substrat und ist von Anfang an dem Konkurrenzdruck von vielen Mikroorganismen ausgesetzt. Es ist bekannt, dass *Bacillus subtilis* kein ausschließlicher Rhizosphärenbesiedler ist. Zudem wurden die in diesen Versuchen verwendeten Stämme dieses Nutzbakteriums aus der Bodenmikroflora isoliert (FREIER et al. 1990a). Die Autoren ermittelten im Wurzelbereich Keimzahlen von *Bacillus subtilis* T99, die etwas mehr als eine Zehnerpotenz über denen im Boden lagen. Dieser Wert wurde durch unsere Einzelversuche zur Populations- und Aktivitätsdynamik in Feldboden annähernd bestätigt. In Quarzsand betrug diese Differenz bei alleiniger Saatgutbehandlung zu Versuchsbeginn bis zu drei Zehnerpotenzen, überstieg ansonsten aber kaum eine Zehnerpotenz. CHAO et al. (1986) sprechen bei fluoreszierenden Pseudomonaden dagegen von Unterschieden zwischen zwei und drei Zehnerpotenzen zwischen Rhizosphärenbereich und Boden. KIM et al. (1997a) verglichen die Wurzelbesiedlung von Winterweizen durch *Bacillus* sp. L324-

92R₁₂ und *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN₁₀. Sie ermittelten dabei unter Feldbedingungen Populationsdichten des *Pseudomonas*-Isolats, die mindestens zehnmal höher lagen als die des *Bacillus*-Stammes. Diese Erkenntnis steht in Einklang mit den oben genannten Aussagen und weist fluoreszierende Pseudomonaden als bessere Rhizosphärenbesiedler aus.

Das im Vergleich zum Quarzsand wesentlich komplexere und damit auch stabilere ökologische System des Feldbodens, insbesondere die Konkurrenz durch die autochthone Mikroflora, bewirkten den leichten Rückgang der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* zum Versuchsende im Feldboden. Dennoch ist zu bemerken, dass dieser im Verlauf des Untersuchungszeitraumes von 30 Tagen unbeträchtlich war. Klare Tendenzen waren kaum ablesbar. Das bedeutet, dass sich die eingebrachte Bakterienpopulation auch in natürlichem Boden über einen relativ langen Zeitraum mit beträchtlicher Keimzahl erhalten kann. REDDY & RAHE (1989a) berichten zwar über einen schnellen Abfall der Populationsdichte von über Saatgutbehandlung eingebrachtem *Bacillus subtilis* im Wurzelraum von Zwiebelsämlingen, stellten andererseits jedoch trotzdem eine Persistenz der Bakterien über den gesamten Versuchszeitraum (14 Wochen) fest. Gründe für die rasche Abnahme der Besiedlungsdichte der Bakterien könnten außer in der Spezifität der verwendeten Isolate auch in der Konkurrenz durch die autochthone Mikroflora zu suchen sein, da die Autoren in sehr biologisch aktivem Substrat arbeiteten.

KLUEPFEL (1993) vermutete, dass *Pseudomonas*-Arten auf Grund ihrer starken Bindung an Wurzelexsudate und daher großen Affinität zur Wurzel eine besondere Rhizosphären-Kompetenz besitzen, wohingegen andere, weniger spezialisierte und weniger an die Wurzel gebundene Bakterien stärker durch biotische Faktoren wie Konkurrenz und Antagonismus beeinflusst werden. Daher sei die Entwicklung ihrer Populationsdichte schlechter voraussagbar. Obwohl die dargestellten Versuche mit einer Dauer von 30, maximal 60 Tagen, nur über einen vergleichsweise kurzen Zeitabschnitt Auskunft geben, lässt sich sagen, dass Populationen von *Bacillus subtilis* unter den gegebenen Versuchsbedingungen wesentlich träger reagieren als die von fluoreszierenden Pseudomonaden. Bei den verwendeten *Bacillus subtilis*-Isolaten war während der Versuchsdauer weder ein schneller Anstieg noch ein rascher Abfall der Besiedlungsdichte um mehrere Zehnerpotenzen zu beobachten, wie mehrfach von *Pseudomonas*-Arten berichtet wird (KLOPPER et al. 1992, KLUEPFEL 1993). Als

Ursache wird der ermittelte hohe Versporungsgrad an Wurzeln und im Substrat angesehen. Dies ist einerseits von Nachteil, da der Anteil vegetativer, stoffwechselaktiver Zellen deutlich geringer ist, als die ermittelten Keimzahlen vermuten lassen, andererseits aber auch von Vorteil, weil sich die *Bacillus subtilis*-Population über einen längeren Zeitraum über dem natürlichen Niveau erhalten kann und damit in besonderem Maße mit einer nachhaltigen Wirkung zu rechnen ist.

Einfluss auf die autochthone Mikroflora

Die Introduktion großer Populationen von Bakterien kann zumindest temporär die autochthone Mikroflora beeinflussen (KLUEPFEL 1993). KLOEPPER & SCHROTH (1981) beobachteten nach Applikation von Antibiotika produzierenden, fluoreszierenden Pseudomonaden ein Absinken der Vermehrungsrate von in der Rhizosphäre lebenden Pilzen und gram-negativen Bakterien. In den eigenen Versuchen ist der Einfluss der *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf die Gesamtkeimzahlen an den peripheren Wurzelbereichen sowie im Substrat jedoch als gering anzusehen. Lediglich in Quarzsand wurde 5 Tage nach der Aussaat eine signifikant höhere Gesamtkeimzahl in den mit dem Nutzbakterium behandelten Varianten festgestellt, aber auch nur dann, wenn *Bacillus subtilis* als Substratbehandlung appliziert worden war. Bereits nach 10 Tagen waren diese Unterschiede nicht mehr zu beobachten. Die Feststellung von REDDY & RAHE (1989b), die eine signifikante Reduzierung der autochthonen Mikroflora durch über Saatgutbehandlung eingebrachten *Bacillus subtilis* beobachteten, ließ sich also nicht bestätigen. Die Gesamtkeimzahlen in beiden Substraten lagen im Wurzelbereich etwa zwei bis drei Zehnerpotenzen über den im Substrat selbst ermittelten Werten. Das entspricht der Größenordnung, die CHAO et al. (1986) bei fluoreszierenden Pseudomonaden fanden (s.o.). Bei *Bacillus subtilis* betrug diese Differenz zumeist nur eine Zehnerpotenz. In Feldboden wurden für die Gesamtkeimzahlen in der Rhizosphäre und im Substrat im Durchschnitt um etwa eine Zehnerpotenz höhere Werte ermittelt als in Quarzsand, was die zahlreicher vorhandene Mikroflora und damit den für *Bacillus subtilis* höheren Konkurrenzdruck in Feldboden belegt. Bei vor den Versuchen festgestellten Gesamtkeimzahlen im trockenen Substrat ergaben sich zwischen Quarzsand (log cfu 4,40) und Feldboden (log cfu 6,59) sogar Unterschiede von mehr als zwei Zehnerpotenzen, die sich im Verlauf des unter Einfluss der Temperatur und vor allem der für das Pflanzenwachstum notwendigen Feuchtigkeit verringerten. Bemerkenswert ist der rasche Anstieg der Gesamtkeimzahlen unmittelbar

nach Versuchsbeginn. Bereits nach 5 Tagen Versuchsdauer kam es auch in der unbehandelten Kontrolle in beiden Substraten zu einer Erhöhung der Gesamtkeimzahl um mehr als eine Zehnerpotenz.

Kombinierte Anwendung mit einem Neem-Präparat

Eine der entscheidenden Fragestellungen der unter Punkt 4.6 beschriebenen Komplexversuche war, inwiefern durch kombinierte Anwendung von *Bacillus subtilis* mit einem Bio-Fungizid auf Neem-Basis synergistische Effekte erzielt werden können. Es ist bekannt, dass die Zugabe bestimmter Stoffe die Boden-Mikroflora qualitativ und quantitativ beeinflussen kann und dass damit antagonistische Bakterien gegen diverse pilzliche Krankheitserreger gezielt gefördert werden können (CANULLO et al. 1992). In Vorbereitung der Komplexversuche war zunächst von Interesse, ob durch Zusatz des Neem-Präparates Rakshak Gold das Nutzbakterium gefördert wird und sich diese Förderung in Besiedlungsdichte und Aktivität niederschlägt. Nach Aussagen von JEYARAJAN et al. (1986) geht der antifungale Effekt des Zusatzes von Neem-Extrakten zum Boden in erster Linie auf die Förderung der antagonistischen Mikroflora zurück. Obwohl antibakterielle Effekte von Neem-Extrakten bekannt sind (EPPLER 1994, COVENTRY & ALLAN 1997, HULLOLI et al. 1998), hatten sich in vorangegangenen *in vitro*-Tests Hinweise auf positive Effekte bestimmter Konzentrationen von Rakshak Gold auf das Wachstum von *Bacillus subtilis*-Kolonien ergeben (ZIMMER et al. 1999a). Auch andere Autoren berichten von z.T. positiven Effekten von Fungiziden auf Populationen nützlicher Bakterien. SIDDIQI & ALEXANDER (1991) beispielsweise stellten eine Vergrößerung der Population von Rhizobien an Leguminosen (Sojabohne und Luzerne) fest, wenn zuvor eine Saatgutbehandlung mit dem Fungizid Aliette erfolgte. Als Ursache dafür kommt in erster Linie die Unterdrückung potenzieller mikrobieller, vor allem pilzlicher Konkurrenz für die Bakterien in Betracht. Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen MAHAFFEE & BACKMAN (1993) bei Kombination von *Bacillus subtilis* mit den fungiziden Wirkstoffen Metalaxyl / PCNB an Baumwolle.

Ogleich die Reisolation von behandeltem Erbsensaatgut bei einem der Versuche eine signifikant höhere Zahl an den Samen anhaftender FZB47-Keime bei Zusatz des Neem-Präparates ergab, kann nicht generell von einem fördernden Effekt von Rakshak Gold auf *Bacillus subtilis* gesprochen werden, da bei den anderen beiden Komplexversuchen diese Tatsache nicht zutage trat. Eine Förderung der Zellteilung der Bakterien durch das Bio-Fungizid ist beim Ansatz der Versuche nicht auszumachen, da in der frisch

angesetzten Bakteriensuspension, die zur Saatgutbehandlung verwendet wurde, noch sämtliche Zellen versport vorlagen. Die Ergebnisse der Komplexversuche zeigen insgesamt, dass eine kombinierte Applikation mit dem Neem-Präparat zu keiner Erhöhung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* führte – weder im Substrat noch im Bereich von Rhizosphäre oder Rhizoplane. Damit wurden die Ergebnisse der *in vitro*-Tests *in vivo* nicht bestätigt. Der wichtigste Grund für diese Tatsache ist darin zu sehen, dass *in vivo* wesentlich mehr Faktoren die Entwicklung der Nutzbakterien bestimmen – in erster Linie die mikrobielle Konkurrenz an der Wurzel und im unsterilen Substrat, aber auch abiotische Faktoren. Durch sie wird die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* offenbar stärker beeinflusst als durch das Neem-Präparat. Zudem wurde *in vitro* die fördernde Wirkung bestimmter Konzentrationen von Rakshak Gold auf die Bakterien ausschließlich anhand der Koloniegröße ermittelt. Eine größere Kolonie lässt jedoch nicht zwangsläufig auf eine höhere Keimzahl schließen. Bei Feldboden und Aussaaterde handelt es sich um Medien, die sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften stark vom *in vitro* verwendeten Nährmedium unterscheiden. Die Puffereigenschaften der Substrate ließen offenbar die fördernden Effekte von Rakshak Gold auf FZB47 nicht zum Tragen kommen. Als weiterer Faktor kommt hinzu, dass bei den *in vitro*-Versuchen nur eine geringe Anzahl von Organismen beteiligt waren – *Bacillus subtilis*, *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani*. Im Gegensatz dazu war bei den Versuchen im Substrat eine Vielzahl weiterer Organismen involviert: die autochthone Mikroflora im Boden und im Wurzelbereich der Pflanzen. Die genannten Faktoren übten einen größeren Einfluss auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* aus als die Zugabe des Neem-Präparates.

Durch die phytopathogenen Pilze *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani* wurde die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* in den Komplexversuchen kaum beeinflusst, was die Ergebnisse aus unseren Versuchsserien 2 und 3 bestätigt. Lediglich bei den Gewächshausversuchen in Feldboden und Aussaaterde kam es im Bereich der Rhizosphäre und – sofern ermittelt – teilweise auch der Rhizoplane zu niedrigeren Keimzahlen des Nutzbakteriums im Vergleich zur Variante ohne Pathogen. Ursache hierfür könnte der durch die Pilze höhere Konkurrenzdruck für *Bacillus subtilis* im Wurzelbereich sein. Demgegenüber steht eine teilweise höhere Populationsdichte der Bakterien im Substrat bei den mit *Phoma pinodella* / *Rhizoctonia solani* inokulierten Varianten. Hinsichtlich der Gesamtkeimzahlen in Rhizosphäre und Substrat wurde bei

allen drei Komplexversuchen keine entscheidende Beeinflussung durch den Zusatz der phytopathogenen Pilze und Rakshak Gold festgestellt. Die im Vergleich zum Substrat um durchschnittlich zwei Zehnerpotenzen höheren Gesamtkeimzahlen an der Wurzel und im wurzelnahen Bereich (Rhizosphäre) zeigen die enge Bindung vieler Mikroorganismen an die Pflanzenwurzel und die deutlich höhere mikrobielle Aktivität im wurzelnahen Bereich. In Aussaaterde war bereits im Vorfeld der Versuche eine signifikant höhere Gesamtkeimzahl ermittelt worden als in Feldboden. Als Ursache dafür werden die grobere Struktur und damit bessere Luftzirkulation in Aussaaterde sowie der höhere Gehalt an organischer Substanz gesehen. Die vor den Versuchen ermittelten Gesamtkeimzahlen waren bei beiden Substrattypen grundsätzlich und fast immer auch signifikant geringer als die Werte nach 30 Tagen Versuchsdauer. Dies bedeutet, dass durch das Einbringen der Pflanzen und der Mikroorganismen die mikrobielle Aktivität des jeweiligen Substrates deutlich erhöht wurde.

Allgemeine Aktivität von *Bacillus subtilis*

Nur dann, wenn die introduzierten Bakteriensporen vegetative, stoffwechselaktive Zellen hervorbringen, können entsprechende antifungale und phytoeffektive Wirkungen erwartet werden (KREBS et al. 1998). Die Aktivität von *Bacillus subtilis* wurde ausgedrückt durch den Versporungsgrad, der mit einer Wärmebehandlung ermittelt wurde. ALBRECHT (1995) konnte mit dieser Methode keine verwertbaren Ergebnisse erzielen, die eigenen Vorversuche dazu lieferten jedoch realistisch erscheinende Resultate. Dennoch ist die Interpretation des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Aktivität von *Bacillus subtilis* schwierig. Das Verhältnis von aktiven zu versporteten Zellen ist als Momentaufnahme zu verstehen. Es unterliegt ständiger Veränderung.

Aus den Ergebnissen der Einzelversuche zur Populations- und Aktivitätsdynamik geht hervor, dass in Feldboden der Versporungsgrad von *Bacillus subtilis* geringer war als in Quarzsand, das heißt die Aktivität war höher. Zudem hatte sich auch der phytopathogene Pilz gegen die natürlich vorhandene mikrobielle Konkurrenz zu behaupten. Beide Fakten erklären den besseren Pathogen unterdrückenden Effekt des Nutzbakteriums in Feldboden (s. Versuchsserie 3). Hervorzuheben ist außerdem die Rolle des pH-Wertes im Substrat. MAHAFFEE & BACKMAN (1993) ermittelten eine schlechtere Wurzelbesiedlung durch *Bacillus subtilis* an Baumwollpflanzen, wenn deren Samen säurebehandelt, aber nicht neutralisiert waren im Vergleich zu Pflanzen aus neutralisierten Samen. Sie fanden geringere Versporungsgrade in der Sphärosphäre

neutralisierter Samen und folgerten daraus, dass die niedrigeren pH-Werte in der Spermosphäre nicht neutralisierter Samen die Sporenkeimung von *Bacillus subtilis* hemmen. Der geringere Anteil aktiver Zellen führte entsprechend zu einer schlechteren Wurzelkolonisierung. Die Autoren beziehen sich auf Arbeiten mit *Bacillus thuringiensis*, dessen optimaler Boden-pH für die Sporenkeimung mit 7,0 angegeben wird, während bei pH 5,0 keine Sporenkeimung mehr erfolgt. WEST et al. (1985) kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei Untersuchungen an *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus cereus*. Sofern von einer Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf *Bacillus subtilis* ausgegangen werden kann, wäre der pH-Wert in Quarzsand (6,78) für die Aktivität der Bakterien günstiger zu beurteilen als der in Feldboden (5,68) und in Aussaaterde (5,60). Allerdings wird im konkreten Fall die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Bakterien als bedeutenderer Einflussfaktor auf deren Aktivität gesehen als der pH-Wert des Bodens. SCHMIDT et al. (2002) berichten, dass die Population von eingebrachtem *Bacillus subtilis* an Zuckerrübenwurzeln größtenteils aus Sporen bestand und durch Bodenmatrixpotenzial und Temperatur nicht wesentlich beeinflusst wurde. Sie konnten keine signifikante Reduktion der durch *Pythium ultimum* hervorgerufenen Umfallkrankheit feststellen. Auch bei den eigenen aktivitätsdynamischen Untersuchungen wurden sowohl in Quarzsand als auch in Feldboden im Wurzelbereich und im Substrat fast immer Versporungsgrade von mehr als 50 % festgestellt.

Die bei kombinierter Anwendung mit einem Neem-Präparat erkennbare Tendenz, dass die Aktivität der introduzierten Bakterien im Substrat größer war als im Bereich von Rhizosphäre und Rhizoplane, besonders deutlich bei den Versuchen in Aussaaterde, zeigt, dass *Bacillus subtilis* in nährstoffreicheren Substraten gut von der organischen Substanz leben kann, ohne auf die Wurzelexsudate der Kulturpflanze angewiesen zu sein. Der im wurzelnahen Bereich herrschende Konkurrenzdruck durch andere Mikroorganismen mit stärkerer Affinität zur Wurzel ist offenbar eine wesentliche Ursache für den höheren Versporungsgrad der eingebrachten Bakterien in diesem Umfeld. Diese Aussage wird dadurch gestützt, dass die ermittelten Gesamtkeimzahlen in der Rhizosphäre ca. zwei Zehnerpotenzen höher lagen als im Substrat, während sich die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* in Rhizosphäre und Substrat kaum unterschied. Praxiserfahrungen mit dem Nutzbakterium haben gezeigt, dass dessen positive Effekte auf die Kulturpflanzen hinsichtlich phytoeffektiver Wirksamkeit und Pathogen unterdrückender Wirkung bei leichten Böden und solchen Böden, die keine

optimalen Bedingungen für die Pflanzen boten, am größten waren. Neben der besseren Durchlüftung von leichten Böden und den damit allgemein besseren Bedingungen für das aerobe Nutzbakterium kommen der geringere Nährstoffgehalt bei ärmeren Böden und die damit stärkere Bindung von *Bacillus subtilis* an die Pflanzenwurzel sowie die geringere mikrobielle Konkurrenz und eine damit verbundene höhere Aktivität der Bakterien als entscheidende Ursache für diese Feststellung in Betracht.

Phytoeffektive Leistung von *Bacillus subtilis*

Einfluss auf das Auflaufverhalten der Testpflanzen

In allen Versuchsserien wurde das Auflaufverhalten der Erbsenpflanzen durch Bakterisierung mit *Bacillus subtilis* nicht beeinflusst – weder hinsichtlich Auflauftrate noch im Hinblick auf den Zeitpunkt des Auflaufens. Bei niedrigen Versuchstemperaturen von 10 °C oder 15 °C hätten am ehesten Unterschiede zwischen den Varianten auftreten können, da sich hier der Auflaufprozess wesentlich langsamer vollzog als bei hohen Temperaturen. Auch ALBRECHT (1995) stellte nur bei Minderqualität des verwendeten Radieschensaatgutes und damit verbundener schlechter Auflauftrate eine Verbesserung des Auflaufens bei kombinierter Saatgut- und Substratbehandlung mit *Bacillus subtilis* fest. KOWALSKI (1992) konnte ebenfalls keinen Einfluss von *Bacillus subtilis*-Behandlungen auf die Auflauftrate von Tomatensamen erkennen. Demgegenüber berichten TIGGES & LINDNER (2000) von einer Auflaufförderung bei Winterweizen und Wintergerste durch Applikation dieses Nutzbakteriums.

Einfluss auf das Wachstum von Spross und Wurzel

Die Behandlungen mit *Bacillus subtilis* förderten in unserer Versuchsserie 1 das Wachstum der Pflanzen, insbesondere das der oberirdischen Pflanzenteile. Eine klare Beziehung von Wachstumsförderung zur introduzierten Bakterienkeimzahl ließ sich nicht finden. Meist waren selbst scheinbar deutliche Wachstumsförderungen nicht statistisch abzusichern, was mit der außerordentlich großen Streuung der Werte sowie mit der auf Grund der Platzverhältnisse im Phytotron begrenzten Anzahl der Wiederholungen zu erklären ist. Eine besondere Rolle beim Zustandekommen phytoeffektiver Leistungen durch das Nutzbakterium spielt der Trägerstoff Kaliumnitrat. Es wurden bei alleiniger Kaliumnitratbehandlung (also ohne *Bacillus subtilis*) ebenfalls nicht unbeträchtlich positive Wachstumseffekte erzielt. Da Quarzsand

als Substrat den Erbsenpflanzen kaum verfügbare Nährstoffe bietet, musste mit einem derartigen Düngeeffekt gerechnet werden. Andererseits wäre insbesondere bei hoher applizierter Dosis (Saatgut- und Substratbehandlung mit einer Bakteriensuspension der Konzentration 10^9 cfu / ml) auch ein gewisser Salzstress für die Erbsenpflanzen durch den Trägerstoff möglich. Es ist jedoch bekannt, dass *Bacillus subtilis* solchen Stress kompensieren kann (TIGGES 1998, BOCHOW et al. 2001). In der nur mit dem Trägerstoff behandelten Variante entsprach die Menge des eingebrachten Kaliumnitrats jener Menge an Trägerstoff, die auch bei einer kombinierten Anwendung (Saatgut- und Substratbehandlung) von *Bacillus subtilis* in einer Konzentration von 10^9 cfu / ml eingebracht wurde. Zwar waren bei einigen Behandlungen mit den Nutzbakterien deutlichere Wachstumseffekte feststellbar als bei alleiniger Applikation des Trägerstoffes, eine exakte Abgrenzung zu dem durch Kaliumnitrat erreichten Düngeeffekt ist auf Grund der fehlenden Signifikanzen jedoch nicht möglich. Bei 10 °C zeigte sich ein gegenteiliger Effekt, also eine geringere Wuchsleistung der Erbsenpflanzen in den mit der Kaliumnitrat-Variante zu vergleichenden Bakterienbehandlungen. Dies könnte auf eine Überkonzentration an *Bacillus subtilis*-Keimen um den Samen und die Pflanzenwurzel zurückzuführen sein, die mit einer Verzögerung der Pflanzenentwicklung einhergeht, welche bei dieser niedrigen Temperatur von den Pflanzen bis zum Versuchsende nicht ausgeglichen werden konnte. Es ist denkbar, dass sich durch die hohe Keimzahl der Bakterien deren Stoffwechselprodukte (z.B. auch Antibiotika) in Konzentrationen anreicherten, die sich negativ auf die Pflanzenentwicklung auswirkten. Eine solche Möglichkeit ist aus der Literatur bekannt (MAURHOFER et al. 1992). Die Stoffwechselaktivität von *Bacillus subtilis* bei niedrigen Temperaturen ist belegt (KILIAN et al. 1998).

Ein Ergebnis unserer ersten Versuchsserie war, dass das Sprosswachstum der Erbsenpflanzen durch die einzelnen Behandlungen stärker gefördert wurde als das Wurzelwachstum. Bei einer Temperatur von 25 °C kam es sogar vielfach zu einer Reduktion der Wurzelfrischmassen gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Ähnliche Erfahrungen machten auch REDDY & RAHE (1989b). Sie fanden heraus, dass drei der von ihnen verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämme das Sprosswachstum von Zwiebelpflanzen förderten, jedoch nur einer das Wurzelwachstum. Dabei sahen sie einen Hauptgrund für die ermittelte Wachstumsförderung in der Reduktion der autochthonen Mikroflora im Wurzelbereich, von der einige parasitische und nicht-

parasitische Mikroorganismen als Stressoren für die Kulturpflanze in Frage kommen. Von zahlreichen Autoren wird hingegen berichtet, dass Behandlungen mit *Bacillus subtilis* gerade das Wurzelwachstum förderten. In unserer Versuchsserie 1 wird die weniger starke Förderung bzw. gar Reduktion des Wurzelwachstums in erster Linie für einen Effekt des Trägerstoffes Kaliumnitrat gehalten. Bei 25 °C verursachte Kaliumnitrat allein die stärkste Verminderung der Wurzelfrischmasse, bei 10 °C wurde der zweitniedrigste Wert in dieser Variante ermittelt. Insgesamt wird eingeschätzt, dass Kaliumnitrat als Trägerstoff für die Praxis durchaus positiv zu bewerten ist, weil damit ein zusätzlicher Düngeeffekt für die Kulturpflanze erreicht werden kann. Für Versuche zum Nachweis phytoeffektiver Wirkungen von *Bacillus subtilis* sollte jedoch nach Möglichkeit mit anderen Trägersubstanzen gearbeitet werden. Es war zu beobachten, dass die Wachstumsförderung bei Temperaturen von 10 °C am größten war, also außerhalb des Wachstumsoptimums der Erbsenpflanzen. Auch REDDY & RAHE (1989a) ermittelten die größte Zunahme der Sprosslängen von Zwiebelpflanzen infolge der Applikation von *Bacillus subtilis* bei niedrigen Temperaturen. Das deckt sich mit der Aussage, dass die Anwendung dieses Nutzbakteriums besonders dann effektiv ist, wenn die Kulturpflanzen keine optimalen Entwicklungsbedingungen vorfinden, also unter biotischem oder abiotischem Stress leiden. Einer der entscheidenden Wirkmechanismen von *Bacillus subtilis*-Stämmen, mit denen deren stressmindernde Effekte zu erklären sind, ist der enzymatische Aufschluss von pflanzenverfügbarem Phosphor als Nährstoff für die Pflanze. KUNISHI & BANDEL (1991) betonen die Bedeutung der mikrobiellen Aufbereitung zur pflanzlichen Aufnahme von Phosphor, insbesondere bei Phosphor-Mangel. IDRIS AHMED (2002) wies nach, dass einige *Bacillus subtilis*-Stämme in der Lage sind, Phytat als Bindungsform von Phosphor in der Pflanze aufzuschließen. Phytat ist ohne diesen enzymatischen Abbau nicht verfügbar für die Pflanze. So wurde die wachstumsfördernde Wirkung der extrazellulären Phytaseaktivität von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 auf Maispflanzen bei Vorhandensein von Phytat und unter Phosphor-Mangel belegt. Gerade in Böden und Substraten ohne optimale Nährstoffversorgung kann die Verfügbarmachung von Phosphor für Wachstum und Vitalität der Pflanzen von großer Bedeutung sein.

Außerdem werden durch *Bacillus* spp. Auxine (IAA) sowie weitere Substanzen mit Auxin-ähnlichen Wirkungen gebildet. Sie haben eine eindeutig stimulierende Wirkung auf das Pflanzenwachstum (CHANWAY & NELSON 1991, IDRIS AHMED 2002). Die

Produktion dieser Substanzen ist an bestimmte Entwicklungsbedingungen für die Bakterien gebunden, wie verhältnismäßig niedrige Temperatur (22 °C), geringe Durchlüftung (in Flüssigkultur) und Dunkelheit. In unserer Versuchsserie 1 könnte die Erreichung der größten phytoeffektiven Wirkung bei niedriger Temperatur (10 °C) auch mit der stärkeren Produktion solcher Auxin-ähnlichen Substanzen durch die Bakterien zu begründen sein. Auch die Ergebnisse von BEAUCHAMP et al. (1991) mit *Pseudomonas* sp. zeigen, dass außerhalb des Wachstumsoptimums von Kartoffelpflanzen sowohl bei niedrigerer (12 °C) als auch bei höherer Temperatur (28 °C) die auf Behandlung mit PGPR zurückzuführende Wachstumsförderung größer war. Über die mikrobielle Produktion von Phytohormonen, wie Cytokinen oder Auxinen bzw. ihrer Präkursoren, berichten ARSHAD & FRANKENBERGER (1991). Wie aus den eben genannten Tatsachen deutlich wird, beeinflussen Umweltfaktoren nicht nur Populationsentwicklung und Aktivität von PGPR schlechthin, sondern auch deren Produktion aktiver Substanzen, die das Pflanzenwachstum sowie die Entwicklung von Pflanzenkrankheiten beeinflussen können. Dabei ist nicht nur die Bildung phytohormonell wirksamer Substanzen zu sehen, sondern auch die weiterer Metabolite, die sich direkt oder indirekt auf die Pflanzenentwicklung auswirken, wie etwa HCN-Verbindungen bei fluoreszierenden Pseudomonaden (SCHIPPERS et al. 1991).

Hinsichtlich der Bewertung des Einflusses von *Bacillus subtilis* auf die Wuchsleistung der Erbsenpflanzen sollen einige Vorüberlegungen angestellt werden. Die Erbse besitzt Samen mit einem großen Endosperm, d.h. vielen Reservestoffen. Dadurch war es in den Versuchen möglich, während des gesamten Zeitraumes von 30 Tagen trotz Verwendung eines nährstoffarmen Substrates (Quarzsand) ohne Düngung auszukommen, ohne dass Mangelsymptome an den Erbsenpflanzen festzustellen waren. Allerdings wirkt sich diese Tatsache auch erschwerend auf den Nachweis wachstumsfördernder und stressmindernder Wirkungen von *Bacillus subtilis* aus. In der ersten Versuchsserie ergaben sich somit zumeist nur tendenzielle Befunde, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten wurden kaum gefunden. Eine weitere Ursache für Schwierigkeiten beim Nachweis von Wachstumseffekten bei der Erbse als Versuchspflanze könnte die mit 30 Tagen relativ kurze Versuchsdauer sein, bei der Auswirkungen auf den Ertrag unberücksichtigt bleiben mussten. Aus technischen Gründen war eine wesentliche Verlängerung des Versuchszeitraumes jedoch nicht möglich. Das Vorhandensein des phytopathogenen Pilzes in unserer Versuchsserie 2

führte dazu, dass in den mit *Bacillus subtilis* behandelten Varianten kaum Wachstumseffekte zu beobachten waren.

Durch die große Streubreite der Einzelwerte waren auch bei den Versuchen in Feldboden (Versuchsserie 3) Unterschiede im Wachstum der Erbsenpflanzen durch die in das System Pflanze - Substrat eingebrachten Mikroorganismen zumeist nicht statistisch zu sichern. Die in der Regel tendenziell höhere vegetative Leistung der mit dem Nutzbakterium behandelten Pflanzen gegenüber der mit *Phoma pinodella* inokulierten Kontrolle ist hauptsächlich mit deren besseren Gesundheitszustand erklärbar. Aber auch die unmittelbar wachstumsfördernde Wirkung durch Stoffwechselprodukte von *Bacillus subtilis*, die den Phytohormonhaushalt der Pflanze beeinflussen, ist als Ursache denkbar. Weitgehend bedeutungslos ist bei dieser Versuchsserie ein Einfluss des Trägerstoffs (Sand) auf das Pflanzenwachstum. Die im Gegensatz zu Versuchsreihe 1 hier ebenfalls geförderte Wurzelfrischmasse der Erbsenpflanzen durch Applikation des untersuchten Nutzbakteriums ist ein Indiz, dass in Versuchsserie 1 festgestellte Reduktionen der Wurzelfrischmassen im Vergleich zur Kontrolle auf den dort verwendeten Trägerstoff Kaliumnitrat zurückgehen. In der ersten Versuchsreihe kam es im Besonderen auch in solchen Varianten zu einer Verminderung der Wurzelfrischmasse, bei denen *Bacillus subtilis* mit einem hohen Titer angewandt worden war, d.h. auch der Trägerstoff in einer hohen Konzentration vorlag.

Der Einfluss der einzelnen Behandlungen auf das vegetative Wachstum der Erbsenpflanzen war auch bei den Komplexversuchen gering. Es wurde deutlich, dass der durch Inokultion mit *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani* hervorgerufene Krankheitsbefall der Testpflanzen sich nach einer Versuchsdauer von 30 Tagen kaum in einem verminderten Pflanzenwachstum niederschlug. Bei beiden Gewächshausversuchen ließ sich unter Pathogeneinfluss sogar ein leicht verstärktes Sprosswachstum feststellen, eine Art positiver Stress durch die Krankheitserreger. Auch wenn eine Behandlung mit *Bacillus subtilis* FZB47 allein in den Gewächshausversuchen zu leicht erhöhtem Sprosswachstum gegenüber der unbehandelten Kontrolle führte, lassen sich Wachstumseffekte durch die introduzierten Bakterien sowie durch das Neem-Präparat auf Grund der fehlenden Signifikanzen nicht hervorheben. Das bessere Pflanzenwachstum in Aussaaterde gegenüber Feldboden weist auf ein für die Entwicklung der Erbsenpflanzen günstigeres Substrat hin. Offenbar waren die Bedingungen im Gewächshaus mit schwankender Temperatur und

Luftfeuchte für das Pflanzenwachstum förderlicher, speziell für das Sprosswachstum, als das genau definierte Temperatur- und Feuchtereime in der Klimakammer.

Antifungale Wirkung von *Bacillus subtilis*

In Quarzsand

Der durch Anwendung der Nutzbakterien nur geringfügig reduzierte Krankheitsbefall in unserer Versuchsserie 2 ist eine Ursache für das weitgehende Fehlen von Wachstumseffekten. Die Inokulation mit *Phoma pinodella* rief bei den Erbsenpflanzen einen starken Krankheitsbefall hervor. Bei anderen Versuchen hatte sich gezeigt, dass der gesundheits- und vitalitätsfördernde Effekt von *Bacillus subtilis* auf die Pflanzen bei einem sehr hohen Schaderregerdruck gering ist (JAMAL 1993). Das ist in ähnlicher Weise auch von anderen PGPR wie fluoreszierenden Pseudomonaden bekannt (XI et al. 1996). Bei zwei Versuchen im Vorfeld der hier beschriebenen Versuchsserie, in denen eine zusätzliche Saatgut-Inokulation mit *Phoma pinodella* angesetzt wurde, ergab sich ein sehr schlechter Ablauf und ein starker Krankheitsbefall an den Erbsenpflanzen, sodass die Mehrzahl der aufgelaufenen Pflanzen trotz Behandlung mit *Bacillus subtilis* bis zum Versuchsende abstarben. In einem künstlichen Substrat ist die Zusammensetzung der Boden-Mikroflora weniger komplex als in natürlichem Boden (VAN PEER & SCHIPPERS 1989). Das ermöglicht eine rasche Ausbreitung von phytopathogenen Mikroorganismen. In dem nährstoffarmen und biologisch wenig aktiven Quarzsand ist die Affinität des Krankheitserregers zur Pflanze sehr hoch. Dementsprechend hoch war bei den eigenen Versuchen auch der Infektionsdruck auf die Pflanzenwurzel bei Inokulation mit dem Pathogen. Somit ist es nicht überraschend, dass die in vorangegangenen *in vitro*-Versuchen festgestellte gute Hemmung von *Phoma pinodella* durch *Bacillus subtilis* (ISSOUFOU 2000) in dieser Versuchsserie nicht bestätigt werden konnte. Dass der Krankheitsbefall durch das Nutzbakterium trotzdem noch um bis zu 23 % vermindert werden konnte, spricht für dessen antagonistische Wirkung. Bei Temperaturen von 20 °C und 25 °C war bei jeweils zwei Varianten mit *Bacillus subtilis*-Behandlung die Verminderung des Krankheitsindex gegenüber der inokulierten Kontrolle signifikant, woraus sich auf eine etwas bessere antifungale Wirksamkeit bei 20 °C und 25 °C im Vergleich zu 15 °C schließen lässt. Das bestätigt Erkenntnisse von JAMAL (1993). Er stellt die Temperatur als wichtigsten ökologischen Einflussfaktor für die antifungale Aktivitätsentfaltung heraus und nennt einen Optimalbereich von 20 °C bis 25 °C. Im Gegensatz dazu beobachteten TEDLA &

STANGHELLINI (1992) einen größeren bakteriellen Antagonismus gegenüber *Pythium aphanidermatum* an Zuckerrübenwurzeln in natürlichem Boden bei 20 °C im Vergleich zu 27 °C. Das traf auch zu ohne Zunahme der Bakterienpopulationen. Die Autoren hielten die Konkurrenz um Nährstoffe für einen wesentlichen Grund für die Unterdrückung von *Pythium aphanidermatum* bei niedrigen Bodentemperaturen.

In Feldboden

Obwohl in Feldboden (Versuchsserie 3) an den Erbsenwurzeln allgemein niedrigere Populationsdichten von *Bacillus subtilis* ermittelt wurden als in Quarzsand, war die Wirkung gegen den pilzlichen Krankheitserreger *Phoma pinodella* in Feldboden deutlich besser. Dies sollte als weiterer Beleg dafür gelten, dass die gesundheitsfördernde Wirkung des Nutzbakteriums keineswegs allein von dessen Besiedlungsdichte abhängt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen GASONI et al. (1998) mit *Pseudomonas fluorescens*. Sie stellten nach 90 Tagen Lagerung der Antagonisten-Formulierung zwar einen Rückgang der Keimzahl um ein Vielfaches fest, konnten aber dadurch keine Beeinträchtigung der antifungalen Leistung gegen *Rhizoctonia solani* beobachten.

Der in den nicht mit *Phoma pinodella* inokulierten Varianten festgestellte Krankheitsbefall wird auf natürlicherweise im Boden vorkommende Krankheitserreger wie *Rhizoctonia solani* und *Fusarium* spp. zurückgeführt. Obgleich die Konzentration der inokulierten Sporensuspension von *Phoma pinodella* in dieser Versuchsserie von $1 \cdot 10^5$ cfu / ml auf $5 \cdot 10^5$ cfu / ml erhöht wurde, war die Symptomausbildung wesentlich schwächer als in Quarzsand, was mit den oben erwähnten besseren Puffereigenschaften des Feldbodens gegenüber Quarzsand zu erklären ist. Möglicherweise liegt darin auch die Begründung für den im Vergleich zu Versuchsserie 2 besseren Biocontrol-Effekt von *Bacillus subtilis* gegen *Phoma pinodella*. Ein zu starker Schaderregerdruck führt oftmals zu einem unbefriedigenden Bekämpfungseffekt durch Nutzbakterien. Mit dem geringeren Erregerdruck in Versuchsserie 3 kam die antagonistische Wirkung der introduzierten Bakterien stärker zum Tragen. Ein weiterer Grund für die bessere antifungale Leistung von *Bacillus subtilis* in Feldboden ist die höhere Aktivität des Bakteriums, ausgedrückt durch den niedrigeren Versporungsgrad, in diesem Substrat. HWANG & CHAKRAVARTY (1992) berichten, dass Bakterien mit den keimenden Sporen pilzlicher Phytopathogene um Nährstoffe konkurrieren und damit die Pathogene erfolgreich reduzieren können.

Ein denkbarer Mechanismus für die antifungale Wirkung von *Bacillus subtilis* ist ferner die Reduktion der Population des Erregers. GAIKWAD et al. (1987) beobachteten eine deutliche Verringerung der Population von *Fusarium oxysporum* im Boden nach Introduktion von *Bacillus subtilis* und begründeten damit die krankheitsunterdrückende Wirkung des Bakteriums.

Zu berücksichtigen ist auch die stoffliche Ebene. Umweltfaktoren beeinflussen die Produktion phytoeffektiv wirksamer Substanzen von *Bacillus subtilis* und anderen Rhizosphärebakterien. Das gilt auch für die Produktion antifungaler Substanzen. Diese konnten GUPTA & UTKHEDE (1987) bei *Bacillus subtilis* in *in vitro*-Versuchen durch Zugabe von Stickstoff und Phosphor zum Nährmedium steigern. JAMAL (1993) erreichte durch zusätzliche Nährstoffapplikation in Form von Ammoniumnitrat und Kaliumdihydrogenphosphat zur Bakterien-Saatgutbehandlung eine verbesserte phytosanitäre Wirkung gegen *Alternaria radicina*. Der höhere Gehalt an Nährstoffen in Feldboden kann also für die bessere Pathogen unterdrückende Wirkung in diesem Substrat auch eine Rolle gespielt haben. Dennoch sind nicht allein hohe Nährstoffgehalte von Vorteil, sondern die Zusammensetzung des Nährmediums bzw. des Substrates. So stellten ISSOUFOU (2000) sowie SCHMIEDEKNECHT et al. (2001) fest, dass eine geringe Verfügbarkeit von Eisen im Testmedium die Konkurrenzfähigkeit von *Bacillus subtilis* erhöhte und dessen antifungale Aktivität verbesserte. In einer anderen Arbeit hoben GUPTA & UTKHEDE (1986) die Bedeutung von Temperatur und pH-Wert auch für die Produktion antifungaler Substanzen durch *Bacillus subtilis* hervor. Ein Maximum erreichen sie in einem Temperaturbereich zwischen 21 °C und 28 °C und bei pH-Werten zwischen 5,0 und 8,0. Die pH-Werte bei den Substraten der in dieser Arbeit dargestellten Versuche liegen ebenso im Optimalbereich. Eine Verbesserung der antagonistischen Wirksamkeit des Nutzbakteriums bei 25 °C im Vergleich zu 15 °C und 20 °C war in Feldboden nicht eindeutig auszumachen. ISSOUFOU (2000) stellte bei höherer Temperatur eine verbesserte antifungale Wirkung von *Bacillus subtilis* fest. Die Produktion antifungaler Substanzen lässt sich unter kontrollierten Bedingungen durch Optimierung der Umweltfaktoren steigern und damit auch eine Verbesserung der Pathogen unterdrückenden Wirkung erreichen. Eine übermäßig hohe Konzentration, beispielsweise von Antibiotika, im Wurzelraum der Pflanzen kann aber auch phytotoxische Wirkung haben (MAURHOFER et al. 1992). Dabei wird davon ausgegangen, dass bei den verwendeten *Bacillus subtilis*-Stämmen die Antibiotika-

Produktion für die antifungale Leistung von eher untergeordneter Bedeutung ist. Die an anderer Stelle bereits hervorgehobene Verminderung negativer Effekte abiotischer Stressoren auf die Pflanze durch Behandlungen mit dem Nutzbakterium soll als Beleg dafür gelten. So gelang es SIEDE & HOPPE (2000), bakterielle Antagonisten gegen die durch *Mycosphaerella pinodes* hervorgerufene Fußkrankheit der Erbse zu finden, bei denen keine Antibiotikabildung nachgewiesen werden konnte. Vielmehr erwiesen sich Siderophoren und gasförmige Substanzen als wichtige antifungale Faktoren.

Die Einzelversuche zur Populations- und Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis*, erbrachten die Erkenntnis, dass in Feldboden mehr Bakterienzellen im Substrat aktiv sind als in Quarzsand. Trotz dieser Tatsache war am Ende des 60 Tage dauernden Langzeitversuchs bei FZB47 kein Absinken der Populationsdichte festzustellen. Wachstumseffekte waren jedoch auch nach dieser Zeit kaum nachweisbar, sodass auch hier keine Korrelation zwischen Keimzahl von *Bacillus subtilis* im Substrat und phytoeffektiver Leistung hergestellt werden konnte. Die Anzahl der Pflanzen, die im nicht sterilen Feldboden Spontaninfektionen mit Wurzel- und Fußkrankheiten zeigten, war nach 60 Tagen deutlich größer als in Versuchsserie 3 nach 30 Tagen. Trotz der am Versuchsende ermittelten hohen Populationsdichte des Nutzbakteriums wurde keine signifikante Unterdrückung dieses Krankheitsbefalls erreicht. Aus früheren Arbeiten ist geht hervor, dass die antagonistische Wirksamkeit von *Bacillus subtilis* gegen pilzliche Krankheitserreger mit der Pflanzenentwicklung nachlässt und die Bakterien vor allem in frühen Entwicklungsstadien der Kulturpflanzen als effektive Antagonisten anzusehen sind (FREIER et al. 1990a).

Bei Kombination mit einem Neem-Präparat

Obwohl sich nach 30 Tagen Versuchsdauer bei den Komplexversuchen kaum Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Varianten erkennen ließen, waren deutliche und zumeist auch statistisch zu sichernde Differenzen im Gesundheitszustand der Pflanzen sichtbar. Der mit einem Krankheitsindex von 22,2 % relativ hohe Krankheitsbefall in der unbehandelten Kontrolle beim Versuch in Feldboden lässt sich mit dem natürlichen Vorhandensein pilzlicher Krankheitserreger in dem nicht sterilisierten Substrat erklären. Der Gehalt an solchen Schaderregern ist in einem industriell hergestellten gärtnerischen Substrat, wie Aussaaterde, entsprechend geringer. Bei allen drei Komplexversuchen wiesen die Erbsenpflanzen in den mit *Phoma pinodella* bzw. *Rhizoctonia solani* inokulierten Kontrollen einen signifikant höheren

Krankheitsindex auf als jene in den nicht inokulierten Varianten. Durch Zugabe von FZB47 und / oder Rakshak Gold wurde mit einer Ausnahme eine zumindest tendenzielle, teilweise auch signifikante, Reduktion des Krankheitsbefalls erreicht.

Zur insektiziden Wirksamkeit des Neem-Wirkstoffes Azadirachtin existieren viele Erfahrungen und so haben Neem-Präparate als nützlingsschonende Insektizide verbreitet große Bedeutung erlangt (SCHMUTTERER 1996). Zur antifungalen Wirkung einiger Neem-Extrakte ist vergleichsweise wenig bekannt. Erst durch die Arbeit von SINGH et al. (1980), die eine hemmende Wirkung gegen mehrere pilzliche Krankheitserreger nachwiesen, war das fungizide Potenzial von Neem-Präparaten Gegenstand späterer Forschungsarbeiten. So stellten GREWAL & GREWAL (1988) eine toxische Wirkung sowohl von Samen- als auch von Blattextrakten des Neem-Baumes gegen viele Pilze unter *in vitro*-Bedingungen fest. PRITHIVIRAJ et al. (1998) erreichten mit dem Produkt Neemazal allein und in Kombination mit Ajoene, einem Inhaltsstoff des Knoblauchs (*Allium sativum*), eine Verminderung der Krankheitsintensität des Echten Mehltaus der Erbse (*Erysiphe pisi*). ROVESTI et al. (1992) berichten von einer guten vorbeugenden und kurativen Wirkung von Neemsamen-Extrakt gegen die Echten Mehltaupilze *Erysiphe graminis* und *Sphaerotheca fuliginea* sowie außerdem gegen *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Bei Zugabe eines Neem-Produkts in den Boden beobachteten JEYARAJAN et al. (1986) verminderte Infektionen durch eine Reihe phytopathogener Pilze, u.a. *Rhizoctonia solani*. ACHIMU & SCHLÖSSER (1992) erreichten mit Neem-Präparaten sowohl präventiv als auch kurativ gute Bekämpfungsergebnisse gegen den Falschen Mehltau der Weinrebe, *Plasmopara viticola*. Weiterhin berichten LEHMANN et al. (1992), PASINI et al. (1997), COVENTRY & ALLAN (1997) sowie BHATTACHARYA & PRAMANIK (1998) von einer antifungalen Wirkung von Neem-Extrakten. LEHMANN et al. (1992) zeigten, dass die fungizide Wirkung nicht auf Azadirachtin, der insektiziden Hauptkomponente des Neembaumes, zurückgeht. STEINHAEUER (1994) gelang die Isolation einer antifungal wirksamen Verbindung aus Neemsamen-Extrakt. Der Autor hielt es jedoch für wahrscheinlich, dass mehrere Inhaltsstoffe eine das Pilzwachstum hemmende Wirkung besitzen.

Die Ergebnisse der eigenen Versuche belegen, dass Behandlungen mit *Bacillus subtilis* prinzipiell zu einer Verminderung des Krankheitsbefalls mit zwei bedeutenden boden- und samenbürtigen pilzlichen Phytopathogenen führen oder zumindest den Krankheitsverlauf verlangsamen. Auch dem Neem-Präparat sind gewisse fungizide

bzw. fungistatische Effekte zuzuschreiben. Neben einer Förderung der antagonistischen Mikroflora durch das Neem-Präparat kommen auch direkte Effekte gegen pilzliche Phytopathogene in Betracht (ROVESTI et al. 1992).

Nutzbakterien und Neem-Präparat waren bei den Komplexversuchen in ihrer Effektivität zur Krankheitsunterdrückung etwa gleich einzuschätzen. Bei gemeinsamer Applikation von FZB47 und Rakshak Gold kam es zu keiner oder einer nur unbedeutenden weiteren Reduktion des Krankheitsindex im Vergleich zur Einzel-Anwendung. Es gab also keine Synergie-Effekte. Wirkungsgrade von kombinierter Anwendung von *Bacillus subtilis* mit diversen Fungiziden, die jene der jeweiligen Einzel-Anwendungen überstiegen, sind aus der Literatur bekannt (CHAKRAVARTY et al. 1990, OBIEGLO et al. 1990, HWANG & CHAKRAVARTY 1992). Die Kombination des Nutzbakteriums mit einem Fungizid zur Verbesserung der Wirkungssicherheit ist insbesondere dann günstig, wenn die Bakterien keine optimalen Umweltbedingungen vorfinden und ihre gewünschte Wirkung nicht entfalten können.

Während im Feldboden der durch *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani* hervorgerufene Krankheitsbefall an den Erbsenpflanzen mit Hilfe von FZB47 und / oder Rakshak Gold zumeist tendenziell reduziert wurde, zeigte sich in Aussaaterde sowohl im Gewächshaus als auch in der Klimakammer eine deutlichere und oftmals signifikante Verminderung des Krankheitsbefalls. Als Grund dafür sind im Wesentlichen die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von Feldboden und Aussaaterde zu nennen. Die verwendete Aussaaterde war ein wesentlich leichteres, grobporigeres und damit besser durchlüftetes Substrat, das damit bessere Entwicklungsbedingungen für das aerobe Bakterium *Bacillus subtilis* bot. Folgerichtig wurden in den Komplexversuchen in Substrat und Rhizosphäre die größeren Populationsdichten und zumindest im Substrat auch die etwas höhere Aktivität der introduzierten Bakterien in Aussaaterde festgestellt. Zudem ist in Feldboden von einem höheren natürlichen Schaderregerdruck auszugehen als in Aussaaterde, was sich in einem deutlich höheren spontanen Befall mit pilzlichen Wurzel- und Fußkrankheiten in der unbehandelten Kontrolle in Feldboden äußerte. Es ist bekannt, dass *Bacillus subtilis* einen sehr hohen Schaderregerdruck nicht zu kompensieren vermag (THOMPSON et al. 1996). Am effektivsten ist das Nutzbakterium bei präinfektioneller Applikation und einem geringen Befallsdruck (ABDELAZIZ 1993).

Durch den Einsatz von *Bacillus subtilis* und dem Neem-Präparat war es nicht möglich, den Befall auf das Niveau der nicht mit den Phytopathogenen inokulierten Varianten zurückzudrängen. Eine tendenzielle und oftmals auch signifikante Reduktion des Krankheitsindex wurde jedoch fast immer erreicht.

In den dargestellten Versuchsreihen konnte mehrfach keine Beziehung zwischen Keimzahl des Nutzbakteriums und dessen Wirkung auf Gesundheit der Erbsenpflanzen gefunden werden. Obwohl im Feldboden in der Rhizosphäre niedrigere Besiedlungsdichten festgestellt worden waren als im Quarzsand, war die Wirkung gegen *Phoma pinodella* im Feldboden wesentlich besser. Entscheidend für die antagonistische Wirkung der Bakterien ist vielmehr deren Aktivität. Wie bereits aus den dargestellten Ergebnissen hervorgeht, ließ sich auch aus den Erkenntnissen aller Versuche keine Korrelation zwischen Populationsdichte von *Bacillus subtilis* und dessen Wirksamkeit hinsichtlich Wachstumsbeeinflussung und Gesundheitsförderung bei den Kulturpflanzen feststellen. Das bestätigt die aus der Literatur bekannten Erkenntnisse, wie sie in Abschnitt 2.3 genannt wurden.

6 Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ergründung des Einflusses ökologischer und edaphischer Faktoren auf das populations- und aktivitätsdynamische Verhalten von verschiedenen *Bacillus subtilis*-Isolaten.

Rückschlüsse für einen Einsatz von *Bacillus subtilis* in der landwirtschaftlich-gärtnerischen Praxis

Die Versuchsergebnisse haben bestätigt, dass *Bacillus subtilis* zu einer aktiven Besiedlung der Pflanzenwurzel fähig ist. Diese Tatsache ist eine der Grundvoraussetzungen für das Zustandekommen phytoeffektiver und antifungaler Effekte. Dagegen ist die Populationsdichte in der Rhizosphäre von sekundärer Bedeutung. Obwohl im biologisch wenig aktiven Substrat die Besiedlungsdichte von *Bacillus subtilis* bei höherer Temperatur deutlich anstieg, waren die größten pflanzenwachstumsfördernden Effekte bei niedrigen Versuchstemperaturen zu beobachten. Das heißt für die Praxis, dass insbesondere bei einer Anwendung von *Bacillus subtilis* im Freiland zur Aussaat oder Pflanzung der Kulturpflanzen im Frühjahr bereits mit einer guten phytoeffektiven und antifungalen Wirksamkeit des Nutzbakteriums zu rechnen ist, auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch keine optimalen Temperaturen für dessen Populationsentwicklung herrschen. Bei zu hohem Schaderregerdruck ist keine ausreichende antifungale Wirkung zu erwarten. Wichtig ist eine rasche Besiedlung von Spermosphäre bzw. Rhizosphäre der Kulturpflanzen durch *Bacillus subtilis*, um den Bakterien einen Konkurrenzvorteil gegenüber bodenbürtigen phytopathogenen Pilzen und Bakterien zu verschaffen. Daher ist eine Saatgut- bzw. Pflanzgutbehandlung mit dem Nutzorganismus einer Substratbehandlung vorzuziehen, wenngleich die Versuchsergebnisse belegen, dass auch mit letzterer eine gute Rhizosphärenbesiedlung durch die introduzierten Bakterien möglich ist. Auch wenn die Wurzelkolonisierung durch *Bacillus subtilis* in Feldboden und Aussaaterde geringer war als in Quarzsand, wurde in den ersteren beiden Substraten eine bessere Wirkung gegen *Phoma pinodella* erreicht. Die Versuchsergebnisse belegen, dass das Vorhandensein vegetativer, stoffwechselaktiver Zellen von *Bacillus subtilis* von größerer Bedeutung ist als dessen Populationsdichte. Aus dieser Erkenntnis heraus sollte bei der Selektion weiterer *Bacillus subtilis*-Stämme darauf geachtet werden, dass unter den üblichen Kulturbedingungen für die Pflanzen diese Isolate einen niedrigen Versporungsgrad, also

eine hohe Aktivität in der Rhizosphäre aufweisen. Denkbar wäre auch die Beigabe von Formulierungshilfsstoffen, die zu einer Aktivitätserhöhung der Nutzbakterien nach ihrer Applikation an den Samen bzw. die Pflanzenwurzel führen. Bei Leguminosen wie der Erbse, die über große Samen und über ein großes Endosperm verfügen und außerdem über die Symbiose mit Rhizobien zur Stickstoffbindung befähigt sind, kommen die Pflanzenwachstum-fördernden Eigenschaften von *Bacillus subtilis* weniger zum Tragen. Aus diesem Grund könnte bei solchen Pflanzen mit Stämmen gearbeitet werden, deren Haupteffekt nicht die Wachstumsförderung ist, sondern die Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber samen- und bodenbürtigen Krankheitserregern.

Boden- und samenbürtige pilzliche Wurzel- und Fußkrankheiten sind chemisch schwer zu bekämpfen, sodass der Einsatz antagonistischer Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis* auf einem solchen Gebiet in jedem Fall Sinn macht.

Felder für weitere Forschungsarbeiten

Zahlreiche Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben sich im Rahmen der Aufklärung des Wirkmechanismus von *Bacillus subtilis* auf die Auffindung phytoeffektiv und antifungal wirksamer Stoffwechselprodukte des Bakteriums konzentriert. Aus den dargestellten Untersuchungen zur Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis* geht hervor, dass ein sehr großer Prozentsatz der Bakterien im Wurzelraum versport, also inaktiviert, vorliegt. Damit kommt der Erhöhung des Anteils stoffwechselaktiver Zellen eine große Bedeutung zu. Dies könnte geschehen durch

- Selektion weiterer *Bacillus subtilis*-Stämme mit höherem Anteil aktiver Zellen unter den Kulturbedingungen wichtiger Nutzpflanzen,
- Kombination von *Bacillus subtilis* mit Adjuvantien, welche die Aktivität der Bakterien fördern.

Die Kombination von *Bacillus subtilis*-Isolaten mit einem Neem-Fungizid in den Komplexversuchen war bereits ein erster Schritt, Wachstum und Aktivität der Bakterien durch Zugabe fördernder Substanzen zu erhöhen. In dieser Richtung sollten die Arbeiten fortgeführt werden.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse umfangreicher populations- und aktivitätsdynamischer Untersuchungen des Nutzbakteriums *Bacillus subtilis* dargestellt. Die Versuche wurden fast ausschließlich unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer durchgeführt.

Besondere Aufmerksamkeit galt der Ergründung des Einflusses ökologischer und edaphischer sowie in Zusammenhang mit der Applikation des Nutzbakteriums stehender Faktoren, so der Temperatur, dem Substrat, der Behandlungsdosis von *Bacillus subtilis*, der Applikationstechnik (Saatgut- und / oder Substratbehandlung), dem verwendeten Stamm des Nutzbakteriums und dem Trägerstoff der *Bacillus subtilis*-Formulierung. Außerdem wurde der Einfluss einer zusätzlichen Inokulation mit den phytopathogenen Pilzen *Phoma pinodella* oder *Rhizoctonia solani* sowie des Zusatzes eines Neem-Präparates zur *Bacillus subtilis*-Behandlung geprüft.

Die Aktivität von *Bacillus subtilis* wurde sowohl direkt über den Versporungsgrad als auch indirekt über die Ermittlung phytoeffektiver und antifungaler Leistung dargestellt.

Anhand der Versuchsergebnisse können folgende Aussagen getroffen werden:

- Die Populationsdichte von *Bacillus subtilis* war in starkem Maße abhängig von der angewendeten Dosis, die sich nach der gesamten Versuchsdauer von 30 bzw. 60 Tagen noch in entsprechend unterschiedlichen Keimzahlen in Rhizosphäre und Substrat niederschlug.
- Eine kombinierte Saatgut- und Substratbehandlung führte zu höheren Populationsdichten von *Bacillus subtilis* in Rhizosphäre und Substrat gegenüber einer alleinigen Saatgutbehandlung.
- Zwischen den verwendeten *Bacillus subtilis*-Isolaten wurden hinsichtlich ihres Besiedlungsverhaltens kaum Unterschiede gefunden. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass FZB27 und FZB47 geringfügig schwächere Wurzelbesiedler sind als FZB24®.
- Die Verwendung von Kaliumnitrat, Sand oder Maisstärke als Trägerstoff für die *Bacillus subtilis*-Formulierung war für das Besiedlungsverhalten des Nutzbakteriums unerheblich.

- Die Entwicklung von *Bacillus subtilis*-Populationen an Pflanzenwurzel und im Substrat war temperaturabhängig. Höhere Versuchstemperaturen hatten größere Populationsdichten zur Folge. Der Temperatureinfluss war in Quarzsand wesentlich stärker als in Feldboden.
- In Quarzsand wurde eine Besiedlung der gesamten Pflanzenwurzel durch *Bacillus subtilis* festgestellt. Dabei wiesen die peripheren Wurzelteile zumeist die größten Populationsdichten auf.
- Die Inokulation mit den phytopathogenen Pilzen *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani* hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die Populationsdichte von *Bacillus subtilis*.
- Die Gesamtkeimzahlen in Rhizosphäre und Substrat wurden durch die Anwendung von *Bacillus subtilis* nicht beeinflusst. Lediglich in Quarzsand wurden in der Rhizosphäre 5 Tage nach Versuchsbeginn höhere Werte in den mit dem Nutzbakterium behandelten Varianten ermittelt.
- Die Aktivität von *Bacillus subtilis* in Rhizosphäre, Rhizoplane und Substrat war gering, der größte Teil der Keime lag versport vor. Die geringsten Versporungsgrade wurden in Quarzsand in der Rhizoplane sowie in Feldboden im Substrat festgestellt.
- Die Behandlungen mit *Bacillus subtilis* hatten allenfalls tendenziell eine leichte Wachstumsförderung der Erbsenpflanzen zur Folge, die sich insbesondere bei den oberirdischen Pflanzenteilen niederschlug.
- Die Applikation des Nutzbakteriums führte zu einem reduzierten Krankheitsbefall der Erbsenpflanzen mit *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani*. Die antifungale Wirkung kam in Feldboden und Aussaaterde wesentlich stärker zum Tragen als in Quarzsand.
- Der Zusatz des Neem-Präparates Rakshak Gold führte *in vivo* weder zu einer signifikanten Erhöhung der Populationsdichte von *Bacillus subtilis* noch zu einer Aktivitätserhöhung. Rakshak Gold hatte als alleinige Anwendung eine ähnlich krankheitsunterdrückende Wirkung wie *Bacillus subtilis*, bei kombinierter Anwendung mit dem Nutzbakterium wurden jedoch keine synergistischen Effekte gegen *Phoma pinodella* und *Rhizoctonia solani* erreicht.

- Es war kein direkter Zusammenhang zwischen Populationsdichte der introduzierten Bakterien in Rhizosphäre und Substrat und deren phytoeffektiver sowie antifungaler Leistung erkennbar. Als Ursache dafür wird der hohe Anteil versporter Zellen in der *Bacillus subtilis*-Population angesehen.
- Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Bedeutung des Besiedlungsverhaltens und der Aktivität von *Bacillus subtilis* für dessen phytoeffektive und antifungale Wirkung diskutiert.

Literaturverzeichnis

- ABDEL-ALIM, A.L.; MIKHAIL, M.S.; BARAKAT, F.M.; LAUX, P.; ZELLER, W. (2001): Biological control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on potatoes by fluorescent pseudomonads and *Bacillus subtilis*. *Phytopathologie* 31 (1), 44.
- ABDEL-ALIM, A.L.; MIKHAIL, M.S.; BARAKAT, F.M.; LAUX, P.; ZELLER, W. (2002): Comparison of fluorescent pseudomonads and *Bacillus subtilis* 24 in their antagonistic activity against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 429 on potatoes in vitro and under field conditions. *Phytopathologie*, 32 (1), 39.
- ABDELAZIZ, O. (1993): Wirkung von *Bacillus subtilis* auf die Entwicklung von Tomatenjungpflanzen in verschiedenen Substraten und zur Bekämpfung von *Fusarium oxysporum*. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- ACHIMU, P.; SCHLÖSSER, E. (1992): Effect of neem seed extracts (*Azadirachta indica* A. Juss) against downy mildew (*Plasmopara viticola*) of grapevine. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 57 / 2b, 423-431.
- AHMED, E.; BOCHOW, H. (1997): Toleranzinduktion durch Stoffwechselprodukte von *Bacillus subtilis* FZB C gegenüber *Meloidogyne*-Befall an Tomate. *Phytopathologie* 27 (3), 46-47.
- ALBRECHT, A. (1994): Antagonistische Wirkung von *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn gegenüber *Rhizoctonia solani* Kühn. Projektarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- ALBRECHT, A. (1995): Untersuchungen zur Populationsdynamik von *Bacillus subtilis* an Radieschen. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- ALEMAYEHU, M.; BOCHOW, H. (1996): Wirkungen wachstumsfördernder Stoffwechselprodukte eines phytosanitär effektiven *Bacillus subtilis*-Isolates auf Vitalität und Toxinempfindlichkeit einer Tomatenzellsuspensionskultur. *Phytopathologie*, 26 (3), 53.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER Jr., W.T. (1991): Microbial production of plant hormones. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 327-334.

- BAHME, J.B.; SCHROTH, M.N. (1987): Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potatoes. *Phytopathology* 77, 1093-1100.
- BAKER, K.F. (1987): Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 67-85.
- BATINIC, T.; SCHMITT, J.; SCHULZ, U.M.; WERNER, D. (1998): Konstruktion von RAPD-Sonden für die Quantifizierung von *Bacillus subtilis* FZB C und dessen antagonistische Wirksamkeit im System *Cucumis sativus* – *Pythium ultimum*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105, 168-180.
- BAUMANN, E.; BIELKA, R.; ENGEL, E.; FRÖHLICH, H.; GATZKE, E.; GEISSLER, T.; HENKEL, A.; HENTSCHEL, A.; HORN, H.; REMPEL, E.; SEIDEL, E.; STANNEK, G.; WÄCHTER, K. (1976): Freilandgemüseproduktion. BIELKA, R.; GEISSLER, T. (Hrsg.), 1. Auflage, Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M.; KING, N.R. (1981): Resistance and structure of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 50, 379-390.
- BEALE, R.E.; THOMAS, J.E.; SWEET, J.B. (1991): Control of soil-borne diseases of vegetable and arable crops using cultivar resistance and antagonistic microorganisms. – In: BEEMSTER, A.B.R.; BOLLEN, G.J.; GERLAGH, M.; RUISEN, M.A.; SCHIPPERS, B.; TEMPEL, A. (Hrsg.): Biotic interactions and soil-borne diseases, 141-146.
- BEAUCHAMP, C.J.; KLOEPPER, J.W.; CHALIFOUR, F.-P.; ANTOUN, H. (1991): Effects of temperature on growth promotion and root colonization of potato by bioluminescent rhizobacteria mutants. – In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 332-335.
- BERG, G.; BALLIN, G. (1994): Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. J. *Phytopathology* 141, 99-110.
- BERGER, F.; HONG LI, D.; WHITE, D.; FRAZER, R.; LEIFERT, C. (1996): Effect of pathogen inoculum, antagonist density and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses. *Phytopathology* 86, 428-433.

- BHATTACHARYA, I.; PRAMANIK, M. (1998): Effect of different antagonistic rhizobacteria and neem products on clubroot of crucifers. *Indian Phytopath.* 51 (1), 87-90.
- BITTON, G.; LAHAV, N.; HENIS, Y. (1974): Movement and retention of *Klebsiella aerogenes* in soil columns. *Plant Soil* 40, 373-380.
- BOCHOW, H. (1989): Nutzung mikrobieller Antagonisten im biologischen Pflanzenschutz gegen pilzliche Wurzel- und Welkeerkrankungen bei der Produktion von Gemüse und Zierpflanzen in Gewächshäusern. *Gartenbau* 36 (11), 338-340.
- BOCHOW, H. (1994): Populationsdynamisches Verhalten von *Bacillus subtilis* beim Einsatz als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft* 301, 355.
- BOCHOW, H. (1995): Mode of action and practical use of *Bacillus subtilis* as complex acting bioproduct. - In: MANKA, M. (Hrsg.): Environmental biotic factors in integrated plant disease control. The Polish Phytopathological Society, Poznan, 97-104.
- BOCHOW, H.; GANTCHEVA, K. (1995): Soil introductions of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent and its population and activity dynamic. *Acta Horticulturae* 382, 164-172.
- BOCHOW, H.; EL-SAYED, S.F.; JUNGE, H.; STAVROPOULOU, A.; SCHMIEDEKNECHT, G. (2001): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108 (1), 21-30.
- BOEREMA, G.H.; PIETERS, R.; HAMERS, M.E.C. (1993): Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Supplement series 2c, d (Additions and corrections): Fungi on field crops: pulse (legumes), forage crops (herbage legumes), vegetables and cruciferous crops. *Neth. J. Pl. Path.* 99 (Suppl. 1), 1-32.
- BOWEN, G.D.; ROVIRA, A.D. (1976): Microbial colonization of plant roots. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14, 121-144.

- BOWEN, G.D. (1991): Microbial dynamics in the rhizosphere: possible strategies in managing rhizosphere populations. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 25-32.
- BRANNEN, P.M. (1995): Potential modes of action for suppression of root diseases and yield enhancement when using *Bacillus subtilis* seed inoculants on cotton. Proceedings Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, TX, USA, January 4-7, 1995, Vol.1, 205-208.
- BRAUN, H. (1930): Der Wurzeltöter der Kartoffel *Rhizoctonia solani* K. Verlag von Julius Springer, Berlin.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; WATERWORTH, Y. (1971): Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. biol. Sci. 24, 925-944.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; FRANKS, N.; HOLLAND, J. (1977): Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. Phytopathology 57, 1027-1034.
- BROWN, M.E. (1974): Seed and root bacterization. Ann. Rev. Phytopathol. 12, 181-197.
- BRÜCKNER, S. (1998): Möglichkeiten einer biologischen Kontrolle von *Verticillium dahliae* Kleb. an Winterraps (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) mit Hilfe antagonistischer Rhizosphärebakterien. Dissertation, Universität Rostock.
- BUCHENAUER, H. (1998): Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. Journal of Plant Diseases and Protection 105 (4), 329-348.
- BULL, C.T.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. (1991): Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Phytopathology 81, 954-959.
- BURR, T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T. (1978): Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. Phytopathology 68, 1377-1383.

- CAMPBELL, R. (1983): Ultrastructural studies of *Gaeumannomyces graminis* in the waterfilms on wheat roots and the effect of clay on the interaction between this fungus and antagonistic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 39-45.
- CAMPBELL, R.; EPHGRAVE, J.M.E. (1983): Effect of bentonite clay on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and its interactions with antagonistic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 129, 771-777.
- CAMPBELL, R.; CLOR, A. (1985): Soil moisture affects the interaction between *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and antagonistic bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 17, 441-446.
- CANULLO, G.H.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. (1992): Changes in the populations of microorganisms associated with the application of soil amendments to control *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Plant Soil* 144, 59-66.
- CHAKRAVARTY, P.; PETERSON, R.L.; ELLIS, B.E. (1990): Integrated control of *Fusarium* damping-off in red pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 20, 1283-1288.
- CHAMBERS, S.C.; MILLINGTON, J.R. (1974): Studies on *Fusarium* species associated with a field planting of 'pathogen-tested' potatoes. *Aust. J. Agric. Res.* 25, 293-297.
- CHANWAY, C.P.; TURKINGTON, R.; HOLL, F.B. (1988): Genotypic coadaptation in plant-growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant Soil* 106, 281-284.
- CHANWAY, C.P.; NELSON, L.M. (1991): Characterization of cultivar specific growth promotion of spring wheat by *Bacillus* sp. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 365.
- CHAO, W.L.; NELSON, E.B.; HARMAN, G.E.; HOCH, H.C. (1986): Colonization of the rhizosphere by biological control agents supplied to seeds. *Phytopathology* 76, 60-65.

- CHET, I.; ORDENTLICH, A.; SHAPIRA, R.; OPPENHEIM, A. (1991): Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 229-236.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. (1983): The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 322-337.
- COVENTRY, E.; ALLAN, E.J. (1997): The effect of neem-based products on bacterial and fungal growth. – In: KLEEBOERG, H.; ZEBITZ, C.P.W. (Hrsg.): Practice oriented results on use and production of neem-ingredients and pheromones V, 237-242.
- CRÜGER, C. (1991): Pflanzenschutz im Gemüsebau. 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- DAVIES, K.G.; WHITBREAD, R. (1989): Factors affecting the colonization of a root system by fluorescent pseudomonads: The effects of water, temperature and soil microflora. *Plant Soil* 116, 247-256.
- Dechema (1992): Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung. Dechema, Frankfurt (M.).
- DOLEJ, S.; BOCHOW, H. (1996): Studies of the mode of action of *Bacillus subtilis* culture filtrates in the model pathosystem tomato seedling – *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 61 (2b), 483-489.
- DOMSCH, K.-H.; GAMS, W.; WEBER, E. (1968): Der Einfluss verschiedener Vorfrüchte auf das Bodenpilzspektrum in Weizenfeldern. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.* 119, 134-149.
- DOMSCH, K.-H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.-H. (1980): Compendium of soil fungi, Vol. 1. Academic Press, London.
- DORENBOSCH, M.J. (1970): Key to nine ubiquitous *Phoma*-like fungi. *Persoonia* 6, 1-14.
- DOWLING, D.N.; BROUGHTON, D.N. (1986): Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40, 131-157.

- DUGASSA GOBENA, D. (1990): Der Einfluss der Antagonisten *Bacillus subtilis* T99 und *Streptomyces flavescens* G 1111 auf die Widerstandsfähigkeit der Tomatensorte 'Harzfeuer' gegenüber *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis et Shoemaker. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- DUGHRI, M.H.; BOTTOMLEY, P.J. (1984): Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. Soil Biol. Biochem. 16, 405-411.
- DUPLER, M.; BAKER, R. (1984): Survival of *Pseudomonas putida*, a biocontrol agent, in soil. Phytopathology 74, 195-200.
- EPPLER, A. (1994): Der hemmende Einfluß von Niemprodukten auf Bakterien. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 301, 383.
- FALKHOF, A.-G.; DEHNE, H.-W.; SCHÖNBECK, F. (1988): Dependence of the effectiveness of induced resistance on environmental conditions. J. Phytopathol. 123, 311-321.
- FREIER, K.; KREBS, B.; JUNGE, H.; BOCHOW, H.; HUBER, J.; HIRTE, W. (1990a): Dosis-Wirkungs-Beziehung und Populationsdynamik bei der Anwendung des Antagonisten *Bacillus subtilis* zur biologischen Bekämpfung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Zentralbl. Mikrobiol. 145, 563-578.
- FREIER, K.; KREBS, B.; JUNGE, H. (1990b): Darstellung populationsdynamischer Untersuchungen des Bakterien-Isolates *Bacillus subtilis* T 99 beim Einsatz gegen den bodenbürtigen Erreger *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* bei Edelnelken. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 266, 324.
- FUKUI, R.; POINAR, E.I.; BAUER, P.H.; SCHROTH, M.N.; HENDERSON, M.; WANG, X.-L.; HANCOCK, J.G. (1994): Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar beet seed. Phytopathology 84 (11), 1338-1345.
- GAIKWAD, S.J.; SEN, B.; MESHRAM, S.U. (1987): Effect of bottlegourd seedcoating with antagonists on seedlings, quantum of the pathogen inside the seedlings and population of the soil against *Fusarium oxysporum*. Plant Soil 101, 205-210.
- GAMLIEL, A.; KATAN, J. (1992): Influence of seed and root exudates on fluorescent pseudomonads and fungi in solarized soil. Phytopathology 82 (3), 320-327.

- GANTCHEVA, K. (1993): Untersuchungen der Populations- und Aktivitätsdynamik von *Bacillus subtilis* zur biologischen Bekämpfung bodenbürtiger, pilzlicher Pflanzenkrankheiten. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K. (1998): Survival of potential biocontrol bacteria in various formulations and their ability to reduce radish damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (1), 41-48.
- GETMANOVA, N. (1997): Prüfung verschiedener Isolate des Pilzes *Rhizoctonia solani* Kühn auf ihre Pathogenität an Erbsen und Kartoffeln und Einfluss einer Behandlung mit dem Nutzbakterium *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn auf den *Rhizoctonia*-Befall. Projektarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- GOOSS, G. (1976): Untersuchungen zur Selektion von Erbsen (*Pisum sativum* L.) mit Widerstandsfähigkeit gegenüber *Pythium*-Arten und *Rhizoctonia solani* K. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- GREWAL, P.S.; GREWAL, S.K. (1988): Selective fungicidal properties of some plant extracts to mushroom weed moulds. *Phytopath. Mediterr.* 27, 112-114.
- GROSCH, R. (1996): Persönliche Mitteilung. Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren / Erfurt e.V.
- GROSCH, R.; MALIES, U.; BOCHOW, H. (1996): Population dynamics of biocontrol agent *Bacillus subtilis* in closed hydroponic plant cultivation systems after application of different cell number. *Bulletin OILB SROP* 19, 134-144.
- GROSCH, R.; JUNGE, H.; KREBS, B.; BOCHOW, H. (1999): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106 (6), 568-580.
- GUPTA, V.K.; UTKHEDE, R.S. (1986): Factors affecting the production of antifungal compounds by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis*, antagonists of *Phytophthora cactorum*. *J. Phytopathol.* 117, 9-16.
- GUPTA, V.K.; UTKHEDE, R.S. (1987): Nutritional requirements for production of antifungal substances by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis* antagonists of *Phytophthora cactorum*. *J. Phytopathol.* 120, 143-153.

- GUPTA, V.P.; BOCHOW, H.; DOLEJ, S.; FISCHER, I. (2000): Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107 (2), 145-154.
- GUTTERSON, N.; HOWIE, W.; SUSLOW, T. (1990): Enhancing effects of biocontrol agents by use of biotechnology. – In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. (Hrsg.): *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Alan R. Liss Inc., New York, 749-765.
- HALL, T.J.; EDGAR DAVIS, W.E. (1990): Survival of *Bacillus subtilis* in silver and sugar maple seedlings over a two-year period. *Plant Disease* 74 (8), 608-609.
- HANDELSMANN, J.; STABB, E.V. (1996): Biocontrol of soilborne pathogens. *The Plant Cell* 8, 1855-1869.
- HANG, N.; SCHULZ, D.; WOLF, G. (2001): Biologische Bekämpfung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Tomaten durch bakterielle Antagonisten. *Phytomedizin* 31 (4), 50.
- HASKY, K.; HOFFMANN-HERGARTEN, S.; SIKORA, R.A. (1996): Systemische Wirkmechanismen antagonistischer Bakterien gegen den Kartoffelzysten-nematoden *Globodera pallida*. *Phytomedizin* 26 (3), 53-54.
- HEBBAR, K.P.; DAVEY, A.G.; MERRIN, J.; MCLOUGHLIN, T.J.; DART, P.J. (1992): *Pseudomonas cepacia*, a potential suppressor of maize soil-borne diseases – seed inoculation and maize root colonization. *Soil Biol. Biochem.* 24, 999-1007.
- HENTSCHEL, K.D. (1991): Biocontrol of seed-borne *Alternaria radicina* on carrots by antagonistic *Bacillus subtilis*. *IOBC/WPRS Bulletin – Bulletin OILB/SROP XIV/1*, 73-76.
- HEYNEN, C.E.; VAN ELSAS, J.D.; KUIKMAN, P.J.; VAN VEEN, J.A. (1988): Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil; the effect of betonite clay on predation by Protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 20, 483-488.
- HIRTE, W.F. (1977): Zur Lebensfähigkeit und Überlebensfähigkeit allochthoner und autochthoner Bakterien im Boden nach einer Superinfektion. *Zbl. Bakt. Abt. II*, 132, 434-451.

- HOFFMANN, G.M.; NIENHAUS, F.; POEHLING, H.-M.; SCHÖNBECK, F.; WELTZIEN, H.C.; WILBERT, H. (1994): Lehrbuch der Phytomedizin. 3., neubearbeitete Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- HOODA, I.; PARASHAR, R.D.; SINDHAN, G.S. (1995): Assessment of percent *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis* infection in cluster bean seed raised from crop sprayed and seed treated with antagonists for controlling bacterial blight infection. *Plant Disease Research* 10 (1), 70-73.
- HÖPER, H.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. (1995): Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax. *Soil Biol. Biochem.* 27, 955-967.
- HOWIE, W.J.; ECHANDI, E. (1983): Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Soil Biol. Biochem.* 15, 127-132.
- HOWIE, W.J.; COOK, R.J.; WELLER, D.M. (1987): Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology* 77, 286-292.
- HOZORE, E.; ALEXANDER, M. (1991): Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 108.
- HULLOLI, S.S.; SINGH, R.P.; VERMA, J.P. (1998): Management of bacterial blight of cotton induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* with the use of neem based formulations. *Indian Phytopath.* 51 (1), 21-25.
- HWANG, S.F.; CHAKRAVARTY, P. (1992): Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root-rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and a fungicide. *Journal of Plant Diseases and Protection* 99 (6), 626-636.
- IDRIS AHMED, E.E. (2002): Investigations on the genetics of plant-growth-promoting substances synthesis by *Bacillus subtilis* / *amyloliquefaciens*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- ISSOUFOU, I. (2000): Effects of ecological factors on the efficiency of the biocontrol and plant growth-promoting activities of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.

- JAMAL, E. (1993): Untersuchungen zur Pflanzenschutzwirkung von *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn und beeinflussende Faktoren gegenüber dem Möhrenscharzfäuleerreger *Alternaria radicina* (Meier et al.). Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- JANKE, K.; HUBERT, K.-E. (1987): Ergebnisse der Überprüfung des Markerbsensortiments der DDR auf Fuß- und Welkekrankheitsresistenz. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 41, 188-190.
- JEYARAJAN, R.; DORAISWAMY, S.; BHASKARAN, R.; JAYARAJ, S. (1986): Effect of neem and other plant products in the management of plant disease in India. Proc. III Int. Neem Conf., Nairobi, 635-644.
- JUNGE, H.; KREBS, B.; HÖDING, B.; OCKHARDT, A.; KÜBART, S. (1999): Abschlussbericht der FZB Biotechnik GmbH zum Forschungsverbundvorhaben „Biologischer Pflanzenschutz zur Bekämpfung bodenbürtiger Schaderreger im Gartenbau“. Berlin.
- KILIAN, M.; JUNGE, H.; STEINER, U.; KRIEG, U. (1998): Einfluss von Umweltfaktoren auf die ertragssteigernde Wirkung von FZB24 *Bacillus subtilis* bei Kartoffeln. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 357, 361.
- KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. (2000): FZB24® *Bacillus subtilis* – Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 53 (1), 72-93.
- KIM, D.-S.; WELLER, D.M.; COOK, R.J. (1997a): Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 87(5), 559-564.
- KIM, D.-S.; COOK, R.J.; WELLER, D.M. (1997b): *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87 (5), 551-558.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. (1978): Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. Bact. Angers, 879-882.

- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M. (1981): Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71, 1020-1024.
- KLOEPPER, J.W. (1991): Development of *in vivo* assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* 81 (9), 1006-1013.
- KLOEPPER, J.W.; WEI, G.; TUZUN, S. (1992): Rhizosphere population dynamics and internal colonization of cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. E.S. Tjamos et al. *Biological control of plant diseases*, Plenum Press, New York, 185-191.
- KLOEPPER, J.W. (1996): Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience* 46 (6), 406-409.
- KLUEPFEL, D.A. (1993): The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31, 441-472.
- KNAPPE, B.; HOPPE, H.-H. (1994): Untersuchungen zur Resistenz von Erbsen (*Pisum sativum* L.) gegenüber *Ascochyta pinodes* (Teleomorph: *Mycosphaerella pinodes*) und *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft*, 301, 121.
- KOCH, E. (1996): Wirkungsweise und Anwendungsmöglichkeiten mikrobieller Antagonisten von Pflanzenkrankheiten. *Gesunde Pflanzen* 48 (1), 11-19.
- KORTEMÄÄ, H.; PENNANEN, T.; SMOLANDER, A.; HAAHTELA, K. (1997): Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and non-rhizosphere sand. *J. Phytopathol.* 145, 137-143.
- KOWALSKI, K. (1992): Untersuchungen zur Überlebensdauer und Aktivitätsentwicklung des Antagonisten *Bacillus subtilis* T99 in behandelten gärtnerischen Substraten. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- KREBS, B.; JUNGE, H.; OCKHARDT, A.; HÖDING, B.; HEUBNER, D.; ERBEN, U. (1993): *Bacillus subtilis* – An effective biocontrol agent. *Pestic. Sci.* 37, 427-433.

- KREBS, B.; HÖDING, B.; KÜBART, S.; ALEMAYEHU WORKIE, M.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; GROSCH, R.; BOCHOW, H.; HEVESI, M. (1998): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (2), 181-197.
- KREBS, B. (1998): Persönliche Mitteilung. FZB Biotechnik GmbH Berlin.
- KREBS, B. (2002): Neue Anwendungsergebnisse mit dem Pflanzenstärkungsmittel FZB24®. *Phytomedizin* 32 (3), 70-71.
- KUNISHI, H.M.; BANDEL, V.A. (1991): Microbe enhanced P uptake by corn under no till and conventional till. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 368.
- LAM, S.T.; TORKEWITZ, N.R. (1991): Role of nutrient utilization in colonization. – In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects*. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 370.
- LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. (1996): The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (7), 2449-2456.
- LAUX, P.; ZELLER, W. (2000): Zum Einsatz bakterieller Antagonisten bei der Feuerbrandbekämpfung im Freiland. *Phytomedizin* 30 (1), 23.
- LAUX, P.; ZELLER, W. (2002): Zur Wirkungsweise bakterieller Antagonisten gegen den Feuerbrand. *Phytomedizin* 32 (1), 40.
- LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; HENDRICKX, M.J.; SCHEFFER, R.J.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. (1995): Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85 (10), 1301-1305.
- LEHMANN, M. (1999): *Bacillus subtilis*-Einsatz in Forstbaumschulen zur Verbesserung der Vitalität und Vegetationsleistung bei Eichensämlingen. 2. Symposium Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau (Tagungsband), Wien, 95-96.

- LEHMANN, W.; IBENTHAL, W.-D.; HEITEFUß, R. (1992): Fungizide Inhaltsstoffe aus den Kernen des Neembaumes (*Azadirachta indica* A. Juss.) – ihre Gewinnung und Wirkung auf Wurzelbranderreger der Zuckerrübe. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 283, 399.
- LEIBINGER, W.; BREUKER, B.; HAHN, M.; MENDGEN, K. (1997): Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology 87 (11), 1103-1110.
- LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. (1993): Suppression of *Fusarium*-wilts by fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. Biocontrol Sci. Technol. 3, 219-234.
- LIDDELL, C.M.; PARKE, J.L. (1989): Enhanced colonization of pea tap roots by a fluorescent pseudomonad biocontrol agent by water infiltration into soil. Phytopathology 79, 1327-1332.
- LIFSHITZ, R.; LIFSHITZ, S.; BAKER, R. (1985): Decrease in incidence of *Rhizoctonia* pre-emergence damping-off by use of integrated chemical and biological controls. Plant Disease 69, 431-434.
- LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. (1995): Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. Phytopathology 85 (10), 1064-1068.
- LIU, Z.L.; SINCLAIR, J.B. (1988): Colonization and population dynamics of *Bacillus* isolate B153-2-2 on soybean root and rhizosphere (Abstr.). Phytopathology 78 (12), 1523.
- LIU, Z.; SINCLAIR, J.B. (1991): Population dynamics of *Bacillus megaterium* B153-2-2 in soybean rhizosphere soil (Abstr.). Phytopathology 81 (10), 1179.
- LIU, Z.L., SINCLAIR, J.B. (1992): Population dynamics of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 in the rhizosphere of soybean. Phytopathology 82 (11), 1297-1301.
- LIU, Z.L.; SINCLAIR, J.B. (1993): Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153-2-2. Soil Biol. Biochem. 25 (7), 849-855.

- LOPER, J.E.; HAACK, C.; SCHROTH, M.N. (1985): Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 49, 416-422.
- LUGTENBERG, B.J.J.; DE WEGER, L.A.; BENNETT, J.W. (1991): Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. – In: Current opinion in microbiology 2, 457-464.
- MAHAFFEE, W.A.; BACKMAN, P.A. (1991): Effects of seed factors on colonization of cotton cultivars by *Bacillus subtilis* GB-03. – In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 346-349.
- MAHAFFEE, W.F.; BACKMAN, P.A. (1993): Effects of seed factors on spermosphere and root colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. Phytopathology 83 (10), 1120-1125.
- MAISS, E. (1987): Einsatz einer Resistenzinduktion durch Kulturfiltrate von *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb. ex Link) Hughes und *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn gegen Virose unter praxisüblichen Anbaubedingungen. Arch. Phytopathol. Pflanzensch. 23, 275-283.
- MALIES, U. (1995): Untersuchungen zur Rhizosphärenbesiedlung durch *Bacillus subtilis* an der Tomate. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- MATTAR, J.; DIGAT, B. (1991): Influence of temperature on growth and siderophore production of *Pseudomonas fluorescens-putida* strains, and consequence for root colonization. – In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 336-339.
- MAURHOFER, M.; KEEL, C.; SCHNIDER, U.; VOISARD, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. (1992): Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathology 82 (2), 190-195.
- MCINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. (1991): Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. Bulletin SROP 14 (8), 328-331.

- MCINTYRE, J.L.; PRESS, L.S. (1991): Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). - In: Kleister, D.L.; Cregan, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 289-295.
- MCKNIGHT, S.E.; ROSALL, S. (1991): Root colonization of cotton seedlings by *Bacillus subtilis* (MBI 600). Bulletin SROP 14 (8), 365-369.
- MEIER, W. (1985): Pflanzenschutz im Feldbau. Huber & Co. AG Presseverlag, Frauenfeld.
- METZLER, B. (1991): Application, nutritional factors, population dynamics and detection of antagonists. - In: BEEMSTER, G.J.; BOLLEN, M.; GERLAGH, M.; RUISSEN, M.A.; SCHIPPERS, B.; TEMPEL, A. (Hrsg.): Biotic interactions and soil-borne diseases, 341-349.
- NAGTZAAM, M.P.M.; BOLLEN, G.J.; TERMORSHUIZEN, A.J. (1998): Efficiency of *Talaromyces flavus* alone or in combination with other antagonists in controlling *Verticillium dahliae* in growth chamber experiments. J. Phytopathol. 146, 165-173.
- NELSON, E.B.; CHAO, W.L.; NORTON, J.M.; NASH, G.T.; HARMAN, G.E. (1986): Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: Possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. Phytopathology 76, 327-335.
- NEWMAN, E.I. (1966): A method of estimating the total length of root in a sample. J. Appl. Ecol. 3, 139-145.
- NEWMAN, E.I.; WATSON, A. (1977): Microbial abundance in the rhizosphere: a computer model. Plant Soil 48, 17-56.
- NGUYEN, T.H.; SCHULZ, D.; WOLF, G.A. (2002): Biologische Bekämpfung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, dem Erreger der Tomatenwelke, durch bakterielle Antagonisten. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 390, 391-392.

- NIRENBERG, H.I. (1976): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 169, 1-117.
- NIRENBERG, H.I.; DALCHOW, J. (1988): *Rhizoctonia solani* ähnliche Pilze: Anastomosegruppen und Pathogenität. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 245.
- NIRENBERG, H. (1996): Anastomosegruppen von *Rhizoctonia solani* – Morphologie und Auftreten in Deutschland. Phytomedizin 26 (2), 55.
- OBIEGLO, U.; KREBS, B.; JUNGE, H. (1990): Einsatz mikrobieller Antagonisten gegen die *Fusarium*-Welke der Edelnelke (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*) in hydroponischen Kulturverfahren. Nachr.-Bl. 44, 169-171.
- OSBURN, R.M.; MILNER, J.L.; OBLINGER, E.S.; MIT, R.S.; HANDELSMAN, J. (1995): Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean of two field sites in Wisconsin. Plant Disease 79, 551-555.
- OWNLEY, B.H.; WELLER, D.M.; ALLDREDGE, J.R. (1991): Relation of soil chemical and physical factors with suppression of take-all by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. – In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 299-301.
- PALAKSHAPPA, M.G.; KULKARNI, S.; HEDGE, R.K. (1989): Effect of organic amendments on the survival ability of *Sclerotinia rolfii* Sacc. – a causal agent of foot rot of betelvine. Mysore J. Agric. Sci. 23, 332-336.
- PARKE, J.L.; ROVIRA, A.D.; BOWEN, G.D. (1984): Soil matric potential affects colonization of wheat roots by a pseudomonad suppressive to take-all (Abstr.). Phytopathology 74, 806.
- PARKE, J.L.; MOEN, R.; ROVIRA, A.D.; BOWEN, G.D. (1986): Soil water flow affects rhizosphere distributions of a seed born biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biol. Biochem. 18, 583-588.
- PARKE, J.L. (1991): Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. – In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 33-42.

- PARRY, J.M.; TURNBULL, P.C.B.; GIBSON, J.R. (1986): Farbatlas der Bacillusarten – Anleitung zur Diagnose. Schober Verlags-GmbH, Hengersberg.
- PASINI, C.; D'AQUILA, F.; CURIR, P.; GULLINO, M.L. (1997): Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. *Crop Protection* 16 (3), 251-256.
- PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. (1995): Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology* 101, 665-672.
- POSTMA, J.; VAN VEEN, J.A. (1991): Influence of competition and predation on the population dynamics of bacteria introduced into soil. – In: Biotic interactions and soil-borne diseases – Proceedings of the First Conference of the European Foundation for Plant Pathology, 35-40.
- PRITHIVIRAJ, B.; SINGH, U.P.; SINGH, K.P.; PLANK-SCHUMACHER, K. (1998): Field evaluation of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*) and Neemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*) for the control of powdery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (3), 274-278.
- RAAIJMAKERS, J.M.; LEEMAN, M.; VAN OORSCHOT, M.M.P.; VAN DER SLUIS, I.; SCHIPPERS, B.; BAKKER, P.A.H.M. (1995): Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85 (10), 1075-1081.
- RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. (1996): Biologische Bekämpfung von Cucumber Mosaic Cucumovirus (CMV) in *Cucumis sativus* L. durch PGPR-vermittelte induzierte systemische Resistenz. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft* 321, 292.
- REASONER, D.J.; GELDREICH, E.E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7.
- REDDY, M.S.; RAHE, J.E. (1989a): Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizospheres. *Soil Biol. Biochem.* 21 (3), 373-378.

- REDDY, M.S.; RAHE, J.E. (1989b): *Bacillus subtilis* B-2 and selected onion rhizobacteria in onion seedling rhizospheres: Effects on seedling growth and indigenous rhizosphere microflora. *Soil Biol. Biochem.* 21 (3), 379-383.
- ROSALL, S.; MCKNIGHT, S.E. (1991): Some effects of *Bacillus subtilis* (MBI 600) on the development of cotton and peanut. *Bulletin SROP* 14(8), 88-92.
- ROSENKRANZ, F. (1996): Untersuchungen zur Wirkung von Nutzbakterienkombinationen gegenüber bodenbürtigen Pflanzenpathogenen. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- ROSENZWEIG, W.D.; STOTZKY, G. (1979): Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: clay minerals and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 1120-1126.
- ROVESTI, L.; DI MARCO, S.; PANCALDI, D. (1992): Effect of neem kernel extract on some phytopathogenic fungi under greenhouse conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 99 (3), 293-296.
- RYDER, M.H.; BORRETT, M.A. (1991): Root colonization by non-fluorescent pseudomonads used for the control of wheat take-all. – In: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects*. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 302-307.
- SANKAR, P.; JEYARAJAN, R. (1996): Compatibility of antagonists with *Azospirillum* in sesamum. *Indian Phytopath.* 49 (1), 67-71.
- SCHER, F.; KLOEPPER, J.W.; SINGLETON, C.A. (1985): Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. *Can. J. Microbiol.* 31, 570-574.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. (1987): Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect on cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 339-358.

- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN PEER, R. (1991): Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 211-219.
- SCHLEGEL, H.G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- SCHMIDT, C.S.; AGOSTINI, F.; WHYTE, J.; SIMON, A.M.; MULLINS, C.M.; LEIFERT, C. (2000a): Einfluss von Boden-pH-Wert, Bodentemperatur und Bodentyp auf die biologische Bekämpfung der Zuckerrüben-Umfallkrankheit (*Pythium ultimum*) mit antagonistischen Bakterien. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 376, 566.
- SCHMIDT, C.S.; AGOSTINI, F.; MULLINS, C.M.; LEIFERT, C. (2000b): Einfluss der Applikationsdosis auf die Besiedlung von Zuckerrübenwurzeln und auf die biologische Bekämpfung der Zuckerrüben-Umfallkrankheit (*Pythium ultimum*) mit antagonistischen Bakterien. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 376, 566-567.
- SCHMIDT, C.S.; AGOSTINI, F.; LEIFERT, C.; MULLINS, C.E. (2002): Einfluss von Bodentemperatur und Bodenmatrixpotential auf die biologische Bekämpfung der *Pythium*-Umfallkrankheit der Zuckerrübe mit antagonistischen Bakterien. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 390, 155.
- SCHMIEDEKNECHT, G. (1990): Antagonistische Wechselwirkungen der Mikroflora des Bodens gegenüber Schaderregern der Kartoffel, insbesondere *Rhizoctonia solani* Kühn. Dissertation, Inst. f. Kartoffelforschung Groß Lüsewitz.
- SCHMIEDEKNECHT, G.; BOCHOW, H.; JUNGE, H. (1996): Biologischer Pflanzenschutz bei Kartoffeln. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft 321, 467.
- SCHMIEDEKNECHT, G.; BOCHOW, H.; JUNGE, H. (1997): Biologische Kontrolle knollen- und bodenbürtiger Erkrankungen der Kartoffel. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 62/3b, 1055-1062.

- SCHMIEDEKNECHT, G.; BOCHOW, H.; JUNGE, H. (1998): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent.-II. Biological control of potato diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (4), 376-386.
- SCHMIEDEKNECHT, G.; ISSOUFOU, I.; JUNGE, H.; BOCHOW, H. (2001): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108 (5), 500-512.
- SCHMUTTERER, H. (1996): Niem – Pflanzenschutz mit Möglichkeiten zur Erhaltung der Biodiversität in Agroökosystemen der Tropen und gemäßigten Klimazonen. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft* 321, 651.
- SCHÖNBECK, F. (1984): Neue Entwicklungen im biologischen und biotechnischen Pflanzenschutz. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. f. Land- und Forstwirtschaft* 223, 46.
- SCHRÖDER, H. (1991): *Mikrobiologisches Praktikum*. 5., durchgesehene Auflage, Volk und Wissen Verlag GmbH, Berlin.
- SCHUBERT, R.; WAGNER, G. (1991): *Botanisches Wörterbuch*. 10. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- SCHULZ, D.; WOLF, G.A. (2001): Einfluß der Motilität, Adhäsion und der Bildung von Siderophoren und Antibiotika von *Ps. fluorescens* B5 und *Ps. corrugata* R117 auf die Rhizosphärenbesiedlung und die antagonistische Wirkung im Microcosmen-Versuch. *Phytomedizin* 31 (4), 54.
- SEIDEL, D.; WETZEL, T.; BOCHOW, H. (1990): *Pflanzenschutz in der Pflanzenproduktion*. Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- SEIDEL, P. (1997): Sind Resistenzinduktoren wirksame Toleranzinduktoren? *Phytomedizin* 27 (3), 26-27.
- SEONG, K.-Y.; HOFTE, M.; BOELEN, J.; VAERSTRAETE, W. (1991): Growth, survival and root colonization of growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biol. Biochem.* 23, 423-428.

- SIDDIQI, M.A.; ALEXANDER, M. (1991): Enhancing rhizobial colonization in the rhizosphere by a systemic fungicide. - In: KLEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Hrsg.): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, 190.
- SIEDE, R.; HOPPE, H.-H. (2000): Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung der durch *Mycosphaerella pinodes* verursachten Fußkrankheit der Erbse (*Pisum sativum* L.). *Phytomedizin* 30 (2), 48-49.
- SILVA, M.T.; SOUSA, J.C.F.; BALASSA, G. (1978): Ultrastructural effects of chemical agents and moist heat on *Bacillus subtilis*. I. *Annales de Microbiologie (Paris)* 129B, 363-375.
- SINCLAIR, J.B. (1989): *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant diseases. - In: Perspectives in plant pathology. Today & Tomorrow's Printers and Publishers, New Dehli, 367-374.
- SINGH, U.P.; SINGH, H.B.; SINGH, R.B. (1980): The fungicidal effect of neem extracts on some soil-borne pathogens of gram (*Cicer arietinum*). *Mycologia* 72 (6), 1077-1093.
- SLININGER, P.J.; JACKSON, M.A. (1991): Nutritional factors regulating growth and antibiotic accumulation by *Pseudomonas fluorescens*. - In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Progress and Prospects. WPRS Bulletin / Bulletin SROP XIV/8, 370.
- SMITH, K.P.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. (1997): Modeling dose-response relationships in biological control: Partitioning host responses to the pathogen and biocontrol agent. *Phytopathology* 87 (7), 720-729.
- SONI, P.S.; KANWAR, R.S. (1989): Effect of soil application of sawdust, rice husk and Vitavax on incidence of sugar cane wilt. *Sugar Cane, Spring 1989*, 14-16.
- SOUSA, J.C.F.; SILVA, M.T.; BALASSA, G. (1978): Ultrastructural effects of chemical agents and moist heat on *Bacillus subtilis*. II. *Annales de Microbiologie (Paris)* 129B, 377-390.

- SPAAR, D.; KLEINHEMPEL, H.; FRITZSCHE, R. (1985): Diagnose von Krankheiten und Beschädigungen an Kulturpflanzen – Gemüse. 1. Auflage, Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- SRIDHAR, R.; RAMAKRISHNAN, G.; JEYARAJAN, R. (1993): Studies on compatibility of *Rhizobium* with biocontrol agent *Bacillus subtilis* in urdbean. J. Biol. Control 2, 51-52.
- STEINHAEUER, B. (1994): Antifungal compounds from *Azadirachta indica*. – In: KLEEGER, H.; ZEBITZ, C.P.W. (Hrsg.): Practice oriented results on use and production of neem-ingredients and pheromones, 3. Workshop, 93-97.
- SUNAINA, V.; KISHORE, V.; SHEKHAWAT, G.S.; KUMAR, M. (1997): Control of bacterial wilt of potatoes in naturally infested soils by bacterial antagonists. Journal of Plant Diseases and Protection 104 (4), 362-369.
- SUSLOW, T.V. (1982): Role of root colonizing bacteria in plant growth. – In: MOUNT, M.S.; LACY, G.H. (Hrsg.): Phytopathogenic Prokaryotes. Academic Press, London, 187-223.
- TEDLA, T.; STANGHELLINI, M.E. (1992): Bacterial population dynamics and interactions with *Pythium aphanidermatum* in intact rhizosphere soil. Phytopathology 82, 652-656.
- THIMANN, K.V. (1964): Das Leben der Bakterien. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- THOMPSON, D.C.; CLARKE, B.B.; KOBAYASHI, D.Y. (1996): Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms. Plant Disease 80 (8), 856-862.
- TIGGES, J. (1998): Einfluss einer Wurzelbakterisierung mit *Bacillus subtilis* auf die Salztoleranz von Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* L.). Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- TIGGES, J.; LINDNER, K. (2000): Erste Ergebnisse zur Wirkung mikrobieller Nutzorganismen in Kombination mit der Elektronenbehandlung gegen samenbürtige Schaderreger an Getreide. Phytomedizin 30 (2), 50.
- TORKEWITZ, N.R.; LAM, S.T. (1991): The effect of the population level of biocontrol bacteria on disease control efficiency (Abstr.). Phytopathology 81 (10), 1179.

- TU, J.C. (1994): Influences of soil temperature and moisture on the survival and population dynamics of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in fox sandy loams. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 59 (3b), 1221-1228.
- TUTZUN, S.; KLOEPPER, J.W. (1994): Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. - In: Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO Division of Soils, 104-109.
- UTKHEDE, R.S.; SMITH, E.M. (1991): Effects of nitrogen and phosphorus on the growth of microorganisms associated with apple replant disease and on apple seedlings grown in soil infested with these microorganisms. J. Phytopathol. 132, 1-11.
- VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. (1989): Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. Can. J. Microbiol. 35, 456-463.
- VANDENHOVE, H.; MERCKX, R.; WILMOTS, H.; VLASSAK, K. (1991): Survival of *Pseudomonas fluorescens* inocula of different physiological stages in soil. Soil Biol. Biochem. 23, 1133-1142.
- VOGEL, G.; HARTMANN, H.D.; KRAHNSTÖVER, K. (1996): Handbuch des speziellen Gemüsebaues. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- WANDKE, H. (1992): Der Einfluss von bakteriellen Antagonisten auf das Wachstum und den Befall von Tomatenpflanzen durch *Phytophthora nicotianae* v. Breda de Haan var. *nicotianae* in NFT. Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- WELLER, D.M. (1983): Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. Phytopathology 73 (11), 1548-1553.
- WELLER, D.M.; COOK, R.J. (1983): Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73, 463-469.
- WELLER, D.M. (1986): Effects of wheat genotype on root colonization by a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* (Abstr.). Phytopathology 76 (10), 1059.
- WELLER, D.M. (1988): Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26, 379-407.

- WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. (1994): Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. – In: O’GARA, F.; DOWLING, D.N.; BOESTEN, B.: Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. VCH, Weinheim, 178 S.
- WEST, A.W.; BURGESS, H.D.; DIXON, T.J.; WYBORN, C.H. (1985): Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil; effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. Soil Biol. Biochem. 17, 657-665.
- WINDELS, C.E.; KOMMEDAHL, T.; SARBINI, G.; WILEY, H.B. (1985): The role of seeds in the delivery of antagonists into the rhizosphere. – In: Ecology and management of soilborne plant pathogens, 141-143.
- WINTER, W.F.; NATHUR, S.R.; NEERGAARD, P. (1974): Seedborne organisms of Argentina – a survey. Pl. Dis. Repr. 58, 507-511.
- XI, K.; STEPHENS, J.H.G.; VERMA, P.R. (1996): Application of formulated rhizobacteria against root rot of field pea. Plant Pathology 45, 1150-1158.
- XU, G.-W.; GROSS, D.C. (1986): Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. Phytopathology 76, 414-422.
- YEHIA, A.H.; EL-HASSAN, S.A.; EL-BAHADLI, A.H. (1982): Biological seed treatment to control *Fusarium* root rot of broad bean. Egypt. J. Phytopathol. 14, 59-66.
- YLIMAEKI, A. (1967): Root rot as a cause of red clover decline in leys in Finland. Annls Agric. enn. 6, 7-59.
- YUEN, G.Y.; SCHROTH, M.N.; MCCAIN, A.H. (1985): Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria. Plant Disease 69, 1071-1075.
- ZHAO, Q.; SCHULZ, D.; WOLF, G.A. (2001): Biologische Bekämpfung von *Leptosphaeria maculans*, dem Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Winterraps. Phytomedizin 31 (4), 57.

- ZIMMER, J.; ISSOUFOU, I.; SCHMIEDEKNECHT, G.; BOCHOW, H. (1998): Population dynamics of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent under controlled conditions. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 63/2b, 489-495.
- ZIMMER, J.; SINGH, B.B.; BOCHOW, H. (1999a): Möglichkeiten der Kombination des Nutzbakteriums *Bacillus subtilis* mit fungiziden Neem-Präparaten. Phytomedizin 29 (2), 46-47.
- ZIMMER, J.; TIGGES, J.; BOCHOW, H. (1999b): Increasing salt tolerance in vegetables by root bacterization with *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. – In: CANARD, M.; BEYSSAT-ARNAOUTY, V. (Hrsg.): Proceedings of the First Regional Symposium for Applied Biological Control in Mediterranean Countries, Cairo, Egypt, October 25-29, 1998, 259-263.

Anhang

Anhang 1: Rezeptur SNA (slight nutrient agar / nährstoffarmer Agar)

1,0 g	KH_2PO_4
1,0 g	KNO_3
0,5 g	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,5 g	KCl
0,2 g	Glucose
0,2 g	Saccharose
1 l	Aqua dest.
17-20 g	Agar-Agar

Der pH-Wert ist mit NaOH auf 5,0-5,5 einzustellen, danach ist 20 min zu autoklavieren.

Zusätze:

100 mg / l	Penicillin G
10 mg / l	Aureomycin
50 mg / l	Streptomycinsulfat

Hinweis:

Antibiotika sind getrennt dem abgekühlten, noch warmen Agar unter ständigem Rühren zuzugeben.

Anhang 2: Rezeptur Erbsen-Agar

150 g	tiefgefrorene Erbsen
5 g	Glucose
10 g	Agar-Agar

Die tiefgefrorenen Erbsen sind in 500 ml Aqua dest. ca. 15 min zu kochen, die Flüssigkeit ist zu dekantieren und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufzufüllen. Der pH-Wert wird mit 0,1 N HCL auf pH 4,5-5,0 eingestellt. Nach Zugabe des Agars erfolgt ein 15 minütiges Autoklavieren.

Zusätze:

Es ist Streptomycinsulfat (MERCK) 150 mg / l nach dem Autoklavieren und Abkühlung des Agars auf ca. 55 °C zuzufügen.

Anhang 3: Rezeptur Waksman-Agar

5 g	Casein Pepton
10 g	Glucose
5 g	NaCl
3 g	Hefeextrakt
20 g	Agar-Agar
1 l	Leitungswasser
pH:	6,6-6,8

Zusätze zur Reisolierung streptomycinresistenter Bakterienstämme:

750 mg / l	Streptomycinsulfat (MERCK)
70 mg / l	Cycloheximid (SIGMA)

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. H. Bochow für die Überlassung des Themas sowie für die fachliche Unterstützung und die wertvollen Hinweise über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Seine hervorragende Betreuung, die motivierenden Worte und seine Geduld haben das Zustandekommen dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht.

Weiterhin gilt mein Dank

- Herrn Dr. G. Schmiedeknecht für die fachlichen Ratschläge und die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit,
- Herrn Dr. K.-D. Hentschel für seine stete Hilfsbereitschaft und die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit,
- Frau Prof. Dr. C. Büttner für ihre Aufgeschlossenheit und ihre kritischen Anregungen,
- Herrn Prof. Dr. U. Burth von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Kleinmachnow für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit,
- Frau Dr. Natalja Wolff für die elektronenmikroskopische Aufnahme von *Bacillus subtilis*,
- Herrn Dr. Ibrahim Issoufou für die konstruktive Zusammenarbeit,
- allen nicht namentlich genannten wissenschaftlichen Mitarbeitern sowie dem technischen Personal des Fachgebiets Phytomedizin, insbesondere Frau G. Frank, für das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft,
- der FZB Biotechnik GmbH, insbesondere Frau Dr. B. Krebs und Herrn Dr. H. Junge, für die Bereitstellung der *Bacillus subtilis*-Stämme und die fachlichen Anregungen,
- Frau Dr. H.I. Nirenberg von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem für die Bereitstellung der *Phoma pinodella*- sowie *Rhizoctonia solani*-Isolate,
- Frau Dr. R. Grosch vom IGZ Großbeeren für die methodischen Anregungen,
- Herrn Dr. Jaskolla von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem für die Unterstützung bei der Literaturrecherche,
- dem BMBF und der Fazit-Stiftung für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Bianka, für die Unterstützung und das Verständnis für meine Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Jens Zimmer

Frankfurt (Oder), Juni 2003